

UTILIZAÇÃO DA FARINHA DA CASCA DE MARACUJÁ (*Passiflora edulis Sims*)
PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS POR *Bacillus* sp. SMIA-2

JOÃO BATISTA BARBOSA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
MARÇO – 2015

UTILIZAÇÃO DA FARINHA DA CASCA DE MARACUJÁ (*Passiflora edulis Sims*)
PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS POR *Bacillus* sp. SMIA-2

JOÃO BATISTA BARBOSA

Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (CCTA/UENF), como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Produção Vegetal.

Orientadora: Prof^a. Ph.D. Meire Lelis Leal Martins.

Coorientador: Prof. DSc. Álvaro Silva Lima.

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
MARÇO – 2015

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do **CCTA / UENF** 149/2015

Barbosa, João Batista

Utilização da farinha da casca de maracujá (*Passiflora edulis Sims*) para produção de enzimas por *Bacillus* sp. SMIA-2 / João Batista Barbosa. – 2015.

96 f. : il.

Orientador: Meire Lelis Leal Martins.

Tese (Doutorado - Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Campos dos Goytacazes, RJ, 2015.

Bibliografia: f. 68 – 83.

1. *Bacillus* sp. 2. Farinha da casca de maracujá 3. Hidrolases 4. Detergentes 5. Fermentação submersa I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. II. Título.

CDD– 664

UTILIZAÇÃO DA FARINHA DA CASCA DE MARACUJÁ (*Passiflora edulis Sims*)
PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS POR *Bacillus* sp. SMIA-2

JOÃO BATISTA BARBOSA

Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (CCTA/UENF), como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Produção Vegetal.

Aprovada em 04 de março de 2015.

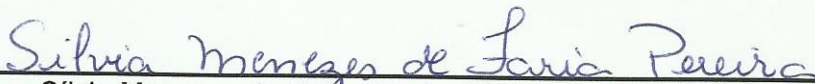
Comissão Examinadora:



Prof^a. Raquel Vieira de Carvalho (DSc., Produção Vegetal) - UFES



Prof^a. Luciana Ribeiro Coutinho de Oliveira Mansur (DSc., Produção Vegetal) - UNESA



Sílvia Menezes de Faria Pereira (DSc., Eng. e Ciência dos Materiais) - UENF



Prof^a. Meire Leis Leal Martins (Ph.D. Molecular Biology and Biotechnology) - UENF
(Orientadora)

A Deus,

Meus pais (Sebasitão e Maria Auxiliadora),

Minha esposa Simone,

Meus irmãos (Fernando, Oldair, Mário Sérgio, Valtecir e José Carlos),

Minha Tia Yolanda.

Dedido com carinho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS por me ter dado forças para não desistir. Sem a presença de DEUS em minha vida, nada teria sentido;

A Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) pela oportunidade de realização do curso de Doutorado;

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela concessão da bolsa de estudo;

À prof^a. Ph.D. Meire Leis Leal Martins pela orientação, pelo incentivo, pela paciência e pelo apoio durante o curso;

Ao prof. DSc. Álvaro Silva Lima pela coorientação, pelo apoio e por ter aberto as portas do LPA/ITP em Aracaju para realização de parceria;

Aos professores integrantes da banca examinadora, Raquel Carvalho, Luciana Mansur e Sílvia Pereira por terem aceitado contribuir com este trabalho;

À minha esposa Simone, pelo amor, pelo carinho, pela amizade, pelo companheirismo, pela cumplicidade, pelo respeito, pelo apoio e pela paciência em todos os momentos. EU TE AMO!

Às companheiras de trabalho do Laboratório de Tecnologia de Alimentos: Erica Cruz, Natiele, Silvania, Erika Fraga, Luciana Coutinho, Andréia e Patrícia, pela companhia e amizade. Em especial agradeço às amigas Erica Cruz e Ana Lúcia pela imensa colaboração neste trabalho;

Às Técnicas do LTA Sílvia Menezes e Ana Lúcia, pela amizade, pelo companheirismo, pelas orações e pelos conselhos durante seis anos de convivência na UENF. E aos demais professores e funcionários do LTA pela presteza;

Aos amigos do LTA, em especial, Geraldo, Diana, Natália, Lorena e Clara pela boa convivência e amizade;

Às novas amigadas conquistadas no IFS Campus Glória e no ITP/Unit (Sergipe) pelo carinho e pela amizade;

Aos professores do IF Sudeste MG Campus Rio Pomba (Maurílio, Eliane e Fabiana) pela amizade e pelo incentivo;

Às amigadas conquistadas na UENF/Campos: Neila, Raphael, Natália, Validoro, Tarcísio, Ana Sílvia, Ritinha, Patrícia, Sílvia e Léo;

Às amigadas da graduação Gabriela, Felipe, Chrystina, Alan, José Pedro, Fernanda, Diana, Nisael, Cleiton e Rosélio pelo carinho e respeito;

Aos meus amigos de MG: Natália, Luciano, Paulim, Alan, Dedé, Vanda, Nathy, Dedê, Lilian (Nem), Tati, que mesmo estando longe sempre me apoiaram;

Aos meus pais Sebastião (Sr. Tatão) e Maria Auxiliadora (Sr^a Dorinha), pelo amor, respeito, exemplo de dignidade e simplicidade. Mesmo com pouco grau de instrução sempre me incentivaram. Obrigado por tudo!

Aos meus irmãos (Fernando, Oldair, Valtecir, Mario Sérgio e José Carlos), aos meus avós (Jair e Lilia), às minhas cunhadas (Claudinéia, Sônia, Vilma, Simone e Valquíria) pelo imenso incentivo, carinho, respeito e amizade. Em especial ao meu irmão Valtecir, por acreditar no meu potencial, pela colaboração de forma material e por ser um dos grandes responsáveis pelo que já conquistei;

À minha tia-avó Yolanda que foi uma das pessoas precursoras de minha formação profissional, pelo carinho e incentivo;

Aos meus sobrinhos (Tayná, Ricardo, Kauã, Joyce, Karyne, Kauane e Laiane), pelo carinho e respeito;

À minha família emprestada (Helena, Fernando, Régis e Emiliane), pela amizade, pelo carinho e pelo incentivo;

Aos meus sogros (Vera e Celso), Vó Elza e aos meus cunhados (Rafael e Guilherme) pelo carinho, pela amizade e pelo respeito;

Aos meus primos, em especial: Erinalda, Mayara, Welton, Laura, Sueli, Aline e Erivelton pelo carinho e apoio;

Aos meus familiares e amigos de Santa Maria (VRB-MG), pela amizade, pelo carinho e pelo apoio;

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
2.1. Objetivo geral.....	3
2.2. Objetivos específicos.....	3
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
3.1. Aproveitamento de resíduos agroindustriais para produção de enzimas.....	4
3.2. Farinha da casca de maracujá.....	6
3.3. Bactérias do gênero <i>Bacillus</i> produtoras de enzimas.....	8
3.4. Enzimas.....	10
3.5. Aplicação industrial de enzimas microbianas.....	12
3.6. Enzimas microbianas termoestáveis.....	15
3.6.1. Celulases.....	15
3.6.2. Xilanases.....	18
3.6.3. Amilases.....	19
3.6.4. Pectinases.....	22
3.6.5. Proteases.....	24
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.1. Micro-organismo.....	27
4.2. Meio de cultura.....	27

4.3. Ativação da linhagem e preparo do inóculo.....	27
4.4. Otimização das condições do meio de cultivo por planejamento experimental e análise estatística.....	28
4.5. Condições da fermentação.....	28
4.6. Determinação do crescimento celular por densidade ótica.....	28
4.7. Determinação do crescimento celular por contagem de colônias.....	28
4.8. Obtenção das enzimas.....	30
4.9. Purificação parcial do complexo enzimático.....	30
4.10. Ensaio enzimáticos.....	30
4.10.1. Celulases.....	30
4.10.1.1. Avicelase.....	30
4.10.1.2. CMCase.....	31
4.10.3. α -amilase.....	31
4.10.4. Xilanase.....	32
4.10.5. Poligalacturonase.....	32
4.10.6. Protease.....	33
4.11. Determinação da proteína.....	33
4.12. Efeito da temperatura na atividade e estabilidade das enzimas.....	34
4.13. Efeito do pH na atividade e estabilidade das enzimas.....	34
4.14. Utilização das enzimas na remoção de manchas de tecidos.....	34
4.15. Estabilidade das proteases a oxidantes.....	35
4.16. Degradação da lisozima.....	35
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
5.1. Crescimento e atividade de celulases, pectinases, xilanases, α -amilases e proteases de <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2 em culturas submersas contendo farinha da casca de maracujá.....	37
5.2. Otimização da produção do conjunto enzimático (proteases, α -amilases, poligalacturonases, xilanases e celulases) de <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2 utilizando planejamento fatorial 2^2 pelo Delineamento Composto Central (DCC).....	47
5.3. Purificação parcial das enzimas e avaliação do efeito da temperatura e do pH em sua atividade.....	52
5.3.1. Precipitação com Sulfato de Amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	52
5.3.2. Efeito da temperatura na atividade e estabilidade das enzimas.....	54

5.3.3. Efeito do pH na atividade e estabilidade das enzimas.....	57
5.3.4. Aplicação das enzimas na remoção de sujidades de tecidos.....	59
5.3.5. Aplicação das enzimas na limpeza de lentes de contato.....	61
6. RESUMO E CONCLUSÕES.....	64
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65

RESUMO

BARBOSA, João Batista; D.Sc. Produção Vegetal. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Março, 2015. UTILIZAÇÃO DA FARINHA DA CASCA DE MARACUJÁ (*Passiflora edulis Sims*) PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS POR *Bacillus sp. SMIA-2*. Orientadora: Prof^a: Ph.D. Meire Lelis Leal Martins. Coorientador: Prof. DSc. Álvaro Silva Lima.

A utilização de enzimas em processos industriais tem aumentado significativamente nos últimos anos. Entretanto, o custo total da sua produção é muito elevado, devido ao alto custo de substratos e meios utilizados. Neste sentido, a utilização de resíduos agroindustriais, como fontes de carbono no processo de produção de enzimas reduz o custo de produção, e também ajuda a resolver os problemas ambientais decorrentes de sua eliminação. Neste trabalho foi avaliado a fisiologia de *Bacillus sp. SMIA-2* em termos do crescimento microbiano e produção de α -amilases, celulases, pectinases, xilanases e proteases utilizando culturas submersas contendo farinha da casca do maracujá suplementadas com água de maceração de milho. Algumas propriedades biotecnológicas deste complexo enzimático foram determinadas a fim de verificar a viabilidade de sua aplicação em processos industriais. A fase exponencial de crescimento do micro-organismo no meio de cultura contendo a farinha da casca de maracujá foi observada durante as primeiras 12 horas de incubação. Após este período de tempo, foi observado que a velocidade de crescimento reduziu e a partir de 36 horas a cultura entrou na fase estacionária. Nesta fase foi observada

a maior secreção das enzimas, sendo os mais altos níveis de atividade encontrados para a protease seguidos da avicelase, poligalacturonase, amilase e xilanase. A otimização das condições do meio de cultivo foi realizada seguindo a técnica de planejamento fatorial em dois níveis (2^2), em relação às variáveis independentes, ao pH inicial do meio de cultura e à concentração de farinha da casca do maracujá, com três repetições do ponto central, totalizando 7 experimentos, durante 72 horas de fermentação à temperatura de 50°C e 150 rpm. Dentre as variáveis independentes estudadas, a concentração de farinha da casca do maracujá foi a que exerceu efeito significativo em todas as variáveis respostas observadas, enquanto o pH inicial do meio exerceu efeito significativo somente na atividade enzimática das enzimas proteases, poligalacturonase, xilanas e avicelases, com um limite de confiabilidade de 95%. As enzimas secretadas pelo *Bacillus* sp. SMIA-2 foram parcialmente purificadas por meio da precipitação do extrato bruto com sulfato de amônio seguido de diálise. As atividades das enzimas após a purificação parcial obtiveram um aumento considerável quando comparadas à atividade dessas enzimas no extrato bruto, destacando-se a protease. A temperatura ótima das avicelases, xilanas, poligalacturonases e proteases foi de 70°C, enquanto da amilase foi de 90°C. Em relação à termoestabilidade, as enzimas apresentaram boa estabilidade à temperatura de 50°C e em pH alcalino na faixa de 7,5-9,5. A protease presente no extrato enzimático foi estável por 180 minutos a 30°C-50°C na presença de oxidantes, foi eficiente na degradação da lisozima e na remoção de sujidades de sangue em tecidos padrões para roupas. Diante do exposto, pode-se concluir que a utilização de farinha da casca de maracujá pode ser utilizada como uma fonte alternativa de baixo valor comercial para a produção de enzimas hidrolíticas extracelulares por *Bacillus* sp. SMIA-2, com potencial para aplicação em processos de detergência.

Palavras-chave: *Bacillus* sp., farinha da casca de maracujá, hidrolases.

ABSTRACT

BARBOSA, João Batista; D.Sc. Vegetal Production. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. March, 2015. EVALUATION OF BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL OF *Bacillus* sp. SMIA-2 TO PASSION FRUIT RIND FLOUR. Prof^a. Advisor: Ph.D Meire Lelis Leal Martins. Co-Advisor: Prof. DSc. Álvaro Silva Lima.

The use of enzymes in industrial processes has increased in recent years. However, its total cost of production is very high due to the high cost of the substrates used. Thus, the use of agro-industrial wastes such as carbon sources in enzyme production process reduces the cost of production, and also helps to solve environmental problems with its disposal. This study evaluated the physiology of *Bacillus* sp. SMIA-2 in terms of microbial growth and production of α -amylases, cellulases, pectinases, xylanases and proteases using submerged cultures containing passion fruit rind flour supplemented with corn steep liquor. Some biotechnological properties of enzymes complex were determined in order to verify the feasibility of their application in industrial processes. The exponential growth phase of the microorganism in a culture medium containing flour of passion fruit rind flour was observed during the first 12 hours of incubation. After this time it was observed that the growth rate reduced and after 36 hours the culture entered in the stationary phase. At this stage was observed an increase in the secretion of enzymes, with the highest levels of activity found for the protease followed by avicelase, polygalacturonase, amylase and xylanase. The optimization of the

culture conditions in the medium was performed according to the factorial design technique at two levels (2^2) with respect to the independent variables, initial pH of the culture medium and flour of passion fruit rind flour concentration with three replications of the center point with a total of 7 experiments. Among the independent variables studied, the flour of passion fruit rind flour concentration was the one that had a significant effect on all variables observed responses, while the initial pH of the medium had a significant effect only in the enzymatic activity of proteases enzymes, poligalacutoronase, xylanases and avicelases. The enzymes secreted by *Bacillus* sp. SMIA-2 were partially purified by precipitation of the crude extract with ammonium sulfate followed by dialysis. The activities of enzymes after partial purification achieved a considerable increase when compared to the activity of these enzymes in the crude extract, being the proteases more pronounced. The optimum temperature of avicelases, xylanases, proteases and polygalacturonases was 70°C, while amylase was 90°C. Regarding to the thermostability, the enzymes showed good stability at 50°C temperature and at pH in the range of 7.5-9.5. The protease present in the enzyme extract was stable for 180 minutes at 30°C-50°C in the presence of oxidants, was effective in degradate the lysozyme and was effective in removing blood from clothing. Therefore in conclusions the use of passion fruit rind flour can be used as an alternative source of low commercial value for the production of extracellular hydrolytic enzymes by *Bacillus* sp. SMIA-2, with potential for application in detergency processes.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil tem um papel de destaque na produção e exportação de frutas, incluindo o maracujá. No entanto, a transformação industrial dessas matérias-primas resulta na geração de grandes quantidades de outros materiais, tais como cascas e sementes (Brijwani et al., 2010; Singhania et al., 2010; Sánchez, 2009). Algumas aplicações sugeridas para a casca do maracujá são a sua utilização como substratos para o crescimento de micro-organismos. Porém, para a utilização destes resíduos, os micro-organismos têm que produzir complexos enzimáticos capazes de degradar os componentes da parede celular (Medeiros et al., 2000). Neste sentido, o conhecimento do mecanismo da interação entre a parede celular vegetal e as enzimas que atuam na sua degradação, é de fundamental importância na viabilização do uso da casca do maracujá, como substrato para a produção de enzimas microbianas.

Bacillus sp. SMIA-2, uma bactéria termofílica, aeróbica e formadora de esporos foi capaz de utilizar celulose, xilana e pectina (Ladeira et al., 2015), soro de queijo e farinha da casca de maracujá (Barbosa et al., 2014) dentre outras fontes de carbono, além de apresentar uma variedade de sistemas de enzimas hidrolíticas. Bactérias do gênero *Bacillus*, com exceção do grupo *Bacillus cereus* (que inclui o *Bacillus anthracis*), são saprófitas inofensivos, que não produzem toxinas e são incluídos no grupo de organismos geralmente reconhecidos como seguros (GRAS) (Mahmood et al., 1998). As espécies termofílicas deste gênero são de considerável interesse biotecnológico, uma vez que as suas enzimas apresentam atividades em condições extremas de temperatura, possibilitando seu uso em muitos processos industriais onde esta condição é necessária (Hough e

Danson,1999). Além disso, têm se mostrado tolerantes a agentes desnaturantes como detergentes e solventes orgânicos (Atomi, 2005).

A utilização de enzimas em processos industriais tem aumentado significativamente nos últimos anos (Graminha et al., 2008). Entretanto, o custo total da sua produção é muito elevado, devido ao alto custo de substratos e meios utilizados. Neste sentido, a utilização de resíduos agroindustriais, como fontes de carbono no processo de produção de enzimas reduz o custo de produção, e também ajuda a resolver os problemas ambientais decorrentes de sua eliminação (Kuberan et al. 2010).

As enzimas são amplamente usadas no processamento de alimentos e em muitos outros ramos da indústria manufatureira. Muitos produtos alimentícios consumidos diariamente, entre os quais o pão e queijo, são produzidos com a utilização deste tipo especial de proteína. Como suplemento de ração animal, desempenham importante papel por reduzirem a produção de resíduos. Também são utilizadas em muitas atividades industriais, como na indústria de produtos de limpeza, no processamento da polpa e do papel, na preparação têxtil e em aplicações médicas onde, com frequência, substituem compostos ou processos químicos (Maller, 2008).

Considerando as aplicações tecnológicas de enzimas nas condições que a indústria exige, o grupo de enzimas atualmente conhecido não é suficiente. Desta forma, a busca por fontes microbianas que produzem enzimas com potencial de aplicação na indústria de detergentes é um tema de grande relevância para a comunidade científica.

Neste trabalho foi avaliado a fisiologia de *Bacillus* sp. SMIA-2 em termos do crescimento microbiano e produção de amilases, celulasas, pectinases, xilanases e proteases utilizando culturas submersas contendo como substrato farinha da casca do maracujá e suplementadas com água de maceração de milho e minerais. Algumas propriedades biotecnológicas deste complexo enzimático foram determinadas a fim de verificar a viabilidade de sua aplicação em processos industriais.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Estudar a capacidade de uma bactéria termofílica *Bacillus* sp. SMIA-2 de utilizar a farinha da casca de maracujá, visando o seu aproveitamento como substrato biotecnológico para a produção de enzimas de interesse industrial.

2.2. Objetivos específicos

Determinar o perfil de produção das enzimas pectinases, proteases, amilases, xilanases, e celulasas por *Bacillus* sp. SMIA-2, em culturas submersas contendo farinha da casca de maracujá e água de maceração de milho;

Otimizar as condições de produção do complexo enzimático por *Bacillus* sp SMIA-2: Efeito da concentração da farinha da casca do maracujá e do pH inicial do meio de cultura;

Estudar a influência da temperatura e do pH na atividade e estabilidade das enzimas;

Estudar a aplicação do complexo enzimático em processos industriais de limpeza.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Aproveitamento de resíduos agroindustriais para produção de enzimas

A agricultura é uma das atividades mais importantes na economia brasileira, que é uma das mais importantes do mundo baseada na produção e exportação de café, cana-de-açúcar, soja, mandioca, frutas entre outros (Ladeira, 2009). Entretanto, o processamento da matéria-prima desses produtos agrícolas gera uma grande quantidade de resíduos, que quando acumulados promove a deterioração do meio ambiente e perda de recursos, com contribuição significativa para o problema da reciclagem e conservação da biomassa (Uenojo e Pastore, 2006). Portanto, existe uma crescente busca da utilização dos resíduos agroindustriais, devido à incessante demanda das atividades agrícolas. Diversos processos são desenvolvidos para utilização desses materiais, transformando-os em compostos químicos e produtos com alto valor agregado como álcool, enzimas, ácidos orgânicos, aminoácidos e outros (Pandey et al., 2000; Pandey et al., 1999; Pandey e Soccol, 1998).

Durante o processamento de produtos animais e vegetais há uma grande geração de resíduos tais como: cascas, sementes, cilindros centrais, aparas, bagaços, membranas e vesículas. Em relação às matérias-primas vegetais estima-se que o aproveitamento não ultrapasse 80% a 85% durante o processamento (Larrauri e Cerezal, 1993) e que os resíduos gerados possam chegar a até 30% (Schaub e Leonard, 1996).

O estudo de meios industriais de fermentação para obtenção de produtos biotecnológicos tem recebido grande atenção nos últimos anos. Diversos

coprodutos e matérias-primas da indústria de alimentos e da agroindústria têm sido empregados para obtenção de produtos biotecnológicos, pela alta disponibilidade e por representarem fonte alternativa de baixo valor comercial (Ernandes et al., 2010; Silva et al., 2009).

Na busca de soluções alternativas para o problema do descarte dos resíduos, muitas indústrias têm optado pelo uso de micro-organismos como agentes redutores de matéria orgânica ou para a eliminação ou redução de compostos tóxicos, sendo as enzimas termoestáveis de grande aplicação nesses processos (Andrade et al., 1999; Tavares et al., 1998).

A aplicação de resíduos agroindustriais em bioprocessos, por um lado fornece substratos alternativos e, por outro, ajuda a contornar os problemas de poluição que sua disposição no meio ambiente poderia causar. Com o advento de inovações biotecnológicas, principalmente na área de tecnologia de enzimas e fermentações, muitos novos caminhos têm sido explorados para sua utilização (Pandey et al., 2000).

Vários resíduos agroindustriais são utilizados como fontes alternativas de substratos para a produção de enzimas, devido à disponibilidade local e por representar uma fonte alternativa de baixo valor comercial, principalmente quando o objetivo é a produção destas enzimas em larga escala (Hernández et al., 2006).

Vários estudos têm apresentado o potencial da utilização de água de maceração de milho como fonte de nitrogênio e carbono para produção de enzimas por micro-organismos termofílicos (Oliveira et al., 2014; Rodrigues et al., 2013; Ladeira et al., 2012; Andrade et al., 2011; Ladeira et al., 2010; Carvalho et al., 2008a; Carvalho et al., 2008b; Silva et al., 2007; Nascimento et al., 2007).

Tendo em vista que o substrato para o crescimento do micro-organismo corresponde a 30-40% do custo da produção de enzimas em escala industrial (Joo e Chang, 2005), Ladeira et al. (2010) e Ladeira et al. (2012) estudaram alternativas a fim de baratear o processo de produção desta enzima como a utilização de resíduos agroindustriais. Corrêa et al. (2011), verificaram que as proteínas do soro de queijo e a água de maceração de milho foram excelentes substratos para a produção de proteases por *Bacillus* sp SMIA-2.

Esses meios podem ser obtidos a partir de várias fontes tais como casca em pó de camarão e caranguejo (Yang et al., 2000), farinha de peixe (Ellouz et al., 2001), farelo de soja (Joo e Chang, 2005; Joo et al., 2002), farinha de

sementes de amaranto (Pastor et al., 2001), penas de frango (Gessesse et al., 2003), soro de queijo e água de maçeração de milho (Rodrigues et al., 2013; Ladeira et al., 2012; Andrade et al., 2011; Ladeira et al., 2010; Carvalho et al., 2008a; Carvalho et al., 2008b; Silva et al., 2007; Nascimento et al., 2007), soro de queijo e farinha da casca de maracujá (Barbosa et al., 2014; Barbosa, 2011).

3.2. Farinha da casca de maracujá

O maracujá (*Passiflora edulis* Sims), conhecido como maracujá azedo ou amarelo, é o mais produzido e comercializado no Brasil (Zeraik et al., 2010), representando 95% dos pomares (Meletti e Bruckner, 2001). Seu cultivo está basicamente voltado para a indústria de sucos e polpas, em especial devido ao seu sabor mais ácido e maior rendimento (Zeraik et al., 2010).

O maracujá é utilizado na elaboração de vários produtos existentes no mercado, resultando na produção de grande quantidade de sementes e cascas, as quais representam mais da metade do peso total do fruto (Tabela 1).

Tabela 1: Composição do maracujá *in natura*

Maracujá	Componente (%)
Casca	50,3
Suco	23,2
Semente	26,2

Fonte: Ferrari et al. (2004).

O Brasil destaca-se como maior produtor e consumidor mundial de maracujá, com produção total de 923.035 mil toneladas em 2012 (Poll et al., 2013). Cerca de 90% das cascas e sementes de maracujá das indústrias de sucos e polpas são descartadas, embora apresentem grande quantidade de fibras, pectina e óleo, sendo o restante aproveitado para diversos fins como, por exemplo, na preparação de ração animal e na fabricação de doce (Oliveira et al., 2002).

O maracujá é uma fruta bastante consumida no mundo e no Brasil, sua polpa contém ácido ascórbico e carotenoides (Talcoot et al., 2003), sua casca contém pectina (21,5%), triptofano, ácidos graxos e aminoácidos (Guertzenstein e Srur, 2002). Em relação aos subprodutos da indústria de sucos, o principal é a

casca do fruto, para a qual foi demonstrado grande potencial de substâncias em sua composição, especialmente fibras solúveis (Ichimura et al., 2006; Córdova et al., 2005).

A casca do maracujá, que representa cerca de 52% da composição da massa do fruto já não pode ser considerada um resíduo industrial, uma vez que suas características e propriedades funcionais podem ser usadas para o desenvolvimento de novos produtos (Pinheiro et al., 2008; Ishimoto et al., 2007; Souza e Sandi, 2001; Medina, 1980). Devido à produção significativa de suco de maracujá, as cascas, tornam-se um problema ambiental. Por isso, torna-se necessário encontrar uma forma viável para transformar as cascas em produtos úteis ou para eliminá-los adequadamente, buscando minimizar o impacto ambiental (Pinheiro et al., 2008; Liu et al., 2006). A tabela 2 apresenta a composição da casca de maracujá que foi determinada por Martins et al. (1985).

Tabela 2: Composição da casca do maracujá amarelo

Componente	Quantidade
Umidade	78,73%
Proteína	2,28%
Extrato etéreo	0,51%
Cinzas	1,61%
Fibras	4,35%
Cálcio	10,98 mg/100g
Fósforo	36,36 mg/100g
Ferro	3,20 mg/100g

Fonte: Martins et al. (1985).

Outros autores encontraram teores de umidade que variaram de 78,73% a 85,96%, 1,46% a 2,28% de proteína, 0,38% a 0,65% de extrato etéreo, 4,8% a 12,5% de carboidratos, 1,02% a 1,61% de cinzas, 4,35% a 8,85% de fibras e 2,3% a 2,7% de pectina (Holanda, 1991).

Farinha da casca de maracujá é um subproduto das fábricas de suco. É muito utilizada para produção de ração animal e descartada como resíduo industrial (Kliemann et al., 2009). A tabela 3 apresenta a composição da farinha da casca de maracujá de acordo com os resultados obtidos por Cazarin et al. (2014).

Tabela 3: Composição da farinha da casca do maracujá

Componente	g.100g⁻¹ (base seca)
Atividade de água (a _w)	0,43
Umidade	9,48
Cinzas	6,88
Proteínas	3,94
Lipídeos	0,31
Carboidratos	79,39

Fonte: Cazarin et al. (2014).

A indústria de alimentos extrai a pectina da casca do maracujá (Kliemann et al., 2009), um aproveitamento racional e eficiente da casca como substrato para a produção de proteínas microbianas poderá gerar resultados satisfatórios na produção em escala industrial (Araújo et al., 2005; Oliveira et al., 2002), contribuindo também para minimizar os problemas de perdas na industrialização do maracujá (Oliveira et al., 2006). Barbosa et al. (2014) verificaram potencial da utilização de farinha da casca de maracujá (0,25% m/v) na formulação de meio de cultivo para produção de proteases por *Bacillus* sp. SMIA-2.

3.3. Bactérias do gênero *Bacillus* produtoras de enzimas

A descoberta de micro-organismos termofílicos abriu novas oportunidades para a descoberta de enzimas que possuem atividade em condições extremas de temperatura, possibilitando seu uso em muitos processos industriais onde esta condição é necessária (Hough e Danson, 1999). As enzimas termofílicas têm se mostrado tolerantes a agentes desnaturantes como detergentes e solventes orgânicos, sendo então, de interesse em vários processos industriais (Atomi, 2005).

Micro-organismos capazes de crescer em temperaturas altas são chamados micro-organismos termofílicos ou termófilos e são classificados em: termófilos moderados, em que a faixa de temperatura de crescimento está entre 20°C e 55°C; termófilos extremos, cujo crescimento se dá em temperaturas de 65°C a 85°C; ou ainda hipertermófilos, quando crescem entre 85°C até 110°C. Os micro-organismos termófilos moderados podem ser encontrados nos domínios *Bacteria*, *Archaea* e *Eukarya* (fungos filamentosos); os micro-organismos termófilos extremos são encontrados nos domínios *Bacteria* e *Archaea*; e os

hipertermófilos apenas são encontrados no domínio *Archaea* (Madigan et al., 2010).

A adaptação de um determinado micro-organismo à termofilia envolve adaptação da membrana citoplasmática, do DNA e das proteínas às temperaturas acima da faixa mesofílica. Essa adaptação à termofilia tem despertado grande interesse na biotecnologia, considerando que os mecanismos de termorresistência das biomoléculas desses micro-organismos podem constituir modelos interessantes para a bioengenharia ou, ainda, considerando o uso direto das mesmas em bioprocessos (Gomes et al., 2007).

As diferenças entre as membranas de termófilos e de mesófilos consistem, principalmente, na substituição de ácidos graxos insaturados por ácidos graxos saturados, de modo que a membrana adquira um equilíbrio entre densidade e fluidez, necessário para a manutenção de sua integridade física e funcional em temperaturas elevadas. Os ácidos graxos saturados geram ambiente mais fortemente hidrofóbico que os insaturados, auxiliando na estabilidade da membrana em altas temperaturas (Haki e Rakshit, 2003).

Os micro-organismos são excelentes fontes de enzimas em razão da grande diversidade e relativa facilidade de produção em larga escala. A obtenção de enzimas a partir de micro-organismos apresenta numerosas vantagens, dentre elas destacam-se a versatilidade e mutação dos micro-organismos, além da facilidade de recuperação das enzimas extracelulares produzidas (Koblitz, 2013).

Os *Bacillus* possuem as células em forma de bastonete e são normalmente aeróbios ou anaeróbios facultativos. Geralmente crescem bem em meios definidos contendo uma dentre as várias fontes de carbono. Muitos *Bacillus* produzem enzimas hidrolíticas extracelulares que degradam polímeros complexos, como polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos e lipídios, permitindo a utilização desses produtos como fonte de carbono e doadores de elétrons (Madigan et al., 2010).

Bactérias do gênero *Bacillus* produzem uma variedade de enzimas extracelulares importantes tais como amilases, proteases, celulasas, poligalacturonases dentre outras. Estas bactérias são capazes de multiplicar sob condições extremas de temperatura e pH e originar produtos estáveis em ampla faixa de ambientes adversos (Wang et al., 2007). Com exceção do grupo *Bacillus cereus* (que inclui o *Bacillus anthracis*), são saprófitas inofensivos que não

produzem toxinas e são incluídos no grupo de organismos geralmente reconhecidos como seguros (GRAS) (Mahmood et al., 1998).

De acordo com Abate (1999), o gênero *Bacillus* é a maior fonte industrial de enzimas e *Bacillus amyloliquefaciens*, é uma das espécies mais utilizadas para a produção de amilases e proteases. Micro-organismos deste gênero são pertencentes ao grupo das bactérias gram-positivas, formadoras de esporos, assim como outros gêneros, tais como *Clostridium*, *Sporosarcina* e *Heliobacterium*.

Enzimas produzidas por micro-organismos que crescem sob altas temperaturas apresentam tantas aplicações biotecnológicas quanto maior a termoestabilidade da biocatransformação, além de proverem dados sobre as bases intrínsecas da estabilidade proteica (Delatorre et al., 2010).

3.4. Enzimas

Enzimas são proteínas que apresentam atividade catalítica (Lima et al., 2001) e são biocatalisadores com excelentes propriedades, tais como elevada seletividade e especificidade, que lhes permitem realizar uma grande variedade de processos químicos sob diversas condições reacionais (Dixon e Webb, 1979). Sua função metabólica exerce influência específica sobre certas interações bioquímicas, usualmente em ambientes muito complexos - como no interior de células - e incluem transformações oxidativas e conjugativas, que ocorrem em altas velocidades catalíticas e com reações altamente seletivas e específicas (Markoglou e Wainer, 2003; Koeller e Wong, 2001).

Presentes em todos os sistemas biológicos, as enzimas são produzidas por todos os organismos vivos e têm a capacidade de atuar fora do meio celular. De acordo com Gacesa e Hubble (1990) e Wiseman (1985), as enzimas extracelulares possuem uma série de vantagens sobre as intracelulares. Por serem secretadas no meio de cultura, não requerem técnicas de ruptura celular, que são difíceis de aplicação em larga escala. Além disso, o número de enzimas secretadas é limitado, sendo relativamente fácil separar a enzima de interesse no meio de crescimento e, por fim, as enzimas extracelulares são mais compactas, sendo menos susceptíveis à desnaturação que as intracelulares.

De acordo com Lima et al. (2001), as enzimas são classificadas em seis

grupos, de acordo com a reação catalisada (Tabela 4):

Tabela 4: Classificação das enzimas de acordo a reação catalisada

Classificação	Reação Catalisada
Oxirredutases	Catalisam reações de oxidorredução.
Transferases	Catalisam reações de transferência de grupos de uma molécula a outra.
Hidrolases	Catalisam reações de hidrólise.
Liases	Catalisam reações de quebra de ligações, formando dupla ligação ou, ainda, catalisam a adição de grupos a duplas ligações.
Isomerases	Catalisam reações de mudança intramolecular em que um substrato é transformado em um produto isômero.
Ligases	Catalisam a ligação covalente de moléculas com simultânea quebra de uma ligação de alta energia.

Fonte: Lima et al. (2001).

As enzimas são ferramentas úteis devido a possíveis aplicações em diferentes setores, como nas indústrias alimentícia, têxtil, de papel e na agricultura, resultando em reduções significativas de custos (Hasan et al., 2006). A tecnologia de enzimas é um campo multidisciplinar sendo reconhecida pela Organização para a Cooperação Econômica e Desenvolvimento (OCED) como importante componente do desenvolvimento industrial sustentável (Cardoso, 2009).

As enzimas constituem o principal alvo da pesquisa em biotecnologia, não apenas por seu papel crucial nos mecanismos celulares, mas também por seu potencial de aplicação na substituição de processos químicos convencionais (Sena et al., 2006; Do Canto e Menezes, 1995).

O papel das enzimas é conhecido em muitos processos, e através dos tempos, com o desenvolvimento de novas técnicas, como a purificação de enzimas, vem aumentando seu número de aplicações. Além disso, com a

disponibilidade das enzimas termoestáveis um número de novas possibilidades para processos industriais tem emergido (Haki e Rakshit, 2003).

3.5. Aplicação industrial de enzimas microbianas

Devido à sua vasta aplicação industrial, assim como no campo farmacêutico (Rao et al., 1998), as proteases formam o grupo mais estudado das hidrolases. Por outro lado, as amilases e celulasas, comumente utilizadas nas indústrias de amido, têxtil e detergente, representam o segundo maior grupo de enzimas (Godfrey e West, 1996). Segundo Tzanov et al. (2001) e Hartzell e Hsieh (1998) as celulasas, lipases, pectinases e proteases podem ser utilizadas eficientemente nos processos de limpeza de fibras de algodão.

O mercado de enzimas e a quantidade de processos com tecnologia enzimática vêm crescendo rapidamente pelos baixos custos dos métodos de produção, pelas novas áreas de aplicação e pelas novas enzimas. A possibilidade de mudanças nas propriedades das enzimas e nos métodos de seleção (*screening*) de enzimas com características diferentes das já encontradas faz com que esses biocatalizadores sejam alvos de aplicações para processos industriais emergentes (Koblitz, 2013).

O mercado global de enzimas industriais é muito competitivo, sendo a Novozymes maior empresa produtora industrial seguida de DSM e DuPont (depois adquiriu uma participação majoritária na sua divisão em Genencor e Danisco), dentre outras. As empresas competem principalmente, com base na qualidade do produto, desempenho, utilização de direitos de propriedade intelectual e de inovar, dentre outros fatores. América do Norte e Europa são os maiores consumidores de enzimas industriais, embora a região Pacífico da Ásia passe por um aumento rápido na demanda de enzima na China, no Japão e na Índia, refletindo o tamanho e a força das economias dos países (Adrio e Demain, 2014).

O mercado internacional de enzimas industriais e especiais é estimado em U\$S 4 bilhões, o mercado externo brasileiro desses biocatalisadores é estimado em cerca U\$S 200 milhões, já levando em consideração a predominância das mercadorias importadas (Andreaus et al., 2014).

Em relação à produção industrial de enzimas microbianas, Fellows (1994)

recomenda que sejam observados os seguintes requisitos: os micro-organismos devem ser capazes de crescer em substratos de baixo custo; a produção de enzima deve ocorrer em um ritmo elevado, constante e em curto espaço de tempo; os métodos para a recuperação das enzimas devem ser simples e de baixo custo; a preparação enzimática obtida deve apresentar estabilidade.

A utilização de diferentes tipos de enzimas nas indústrias tem surgido como uma das possibilidades de se tornar os processos tecnológicos mais eficientes, com elevados rendimentos e sem causar grandes danos ao meio ambiente (Nigan, 2013; Hasan et al., 2006). A demanda mundial de utilização dessas enzimas tem crescido anualmente, sendo mais de 90% do seu comércio efetuado por países como Estados Unidos, alguns da Europa e Japão. Existe uma expectativa de crescimento desse mercado e se esperam para os próximos anos gastos superiores a 2,7 bilhões de dólares, com previsões futuras de aumento em torno de 4% (Adrio e Demain, 2014; Li et al., 2012; Johannes e Zhao, 2006; Demain e Adrio, 2008).

As enzimas proteolíticas, principalmente as alcalinas, correspondem a 60% desse montante (Merheb et al., 2007), sendo que 40% deste valor são de fontes microbianas (Gupta et al., 2002a; Gupta et al., 2002b) e cerca de 35% respondem pelas proteases que são aplicadas na indústria de detergentes (Hadj-Ali, 2007). As amilases vêm logo em seguida movimentando 30% deste mercado (Van der Maarel et al., 2002). Em relação ao mercado brasileiro, este é ainda pouco representativo, correspondendo a cerca de 2% do total mundial (Mussato et al., 2007). Os maiores consumidores são as indústrias de detergentes, alimentos e rações, papel e celulose, química fina e fármacos, seguidas pela indústria têxtil e de manufatura de couros (Pszczola, 2001).

Embora, tradicionalmente, as enzimas mais estudadas sejam de origem animal ou vegetal, as enzimas microbianas apresentam alto interesse do ponto de vista da sua aplicação industrial por serem mais facilmente produzidas em larga escala via fermentação, mais facilmente expressas (clonagem) em micro-organismos de cultivo já estabelecido e pela enorme diversidade microbiana existente, que oferece infinitas possibilidades de modos de ação, nas mais diversas condições. Um bom exemplo disso é a produção de enzimas termorresistentes por micro-organismos extremófilos (Haki e Rakshit, 2003). A maioria das enzimas empregadas em processos industriais pertence ao grupo das

hidrolases (Oliveira et al., 2006), dentre as quais se destacam as proteases e amilases (Ghorbel et al., 2003).

As enzimas encontradas na natureza têm sido usadas desde os tempos antigos na produção de produtos alimentícios, tais como queijo, fermento, cerveja, vinho, vinagre e na fabricação de produtos, tais como couro e linho. Entretanto, a produção industrial de enzimas é o resultado de um desenvolvimento rápido, principalmente nas últimas quatro décadas, graças à evolução da biotecnologia moderna (Kirk et al., 2002). Portanto, existem muitas enzimas produzidas por micro-organismos que são potencialmente utilizadas no processo industrial devido às suas características específicas (Carmelo et al., 2002; Godfrey e West, 1996; Wiseman, 1985).

Nos últimos anos, as enzimas hidrolíticas vêm sendo mais utilizadas nos processos industriais, sendo aplicadas na degradação de várias substâncias naturais (Oliveira et al., 2006). De forma geral, elas são usadas em grande escala nas indústrias têxteis (amilases, celulasas, pectinases, oxidorreduções), de detergentes (celulase, lipase, protease, oxidorredução), alimentícia (celulase, lactase, lipase, pectinase, protease, oxidorredução), de papel (lipase, oxidorredução, xilanase), e de couro (lipase e protease) (Kirk et al., 2002; Nielsen e Oxenbøll, 1998). A tabela 5 apresenta as principais aplicações das enzimas microbianas.

Tabela 5: Enzimas microbianas e suas aplicações

Enzimas	Fonte	Aplicação	Indústria
Amilases	Fungos	Pães	Panificação
	Bactéria	Revestimento do amido	Papel
	Fungos	Fabricação de xaropes e glicose	Alimentícia
	Bactéria	Amido de lavanderia para desengomagem a frio	Amido
	Fungos	Auxiliar digestivo	Farmacêutica
	Bactéria	Remoção de revestimentos (desengomador)	Têxtil
	Bactéria	Remoção de manchas, detergentes	Lavanderia
Proteases	Fungos	Pães	Panificação
	Bactéria	Remoção de manchas	Lavagem a seco
	Bactéria	Amaciante de carnes	Carnes
	Bactéria	Limpeza de fermentos	Medicina
	Bactéria	Desengomador	Têxtil
	Bactéria	Detergentes domésticos	Lavanderia

Pectinases	Fungos	Prensagem, clarificação	Vinhos, sucos de frutas
Celulases	Bactéria	Amaciante e abrillantador de tecidos, detergentes	Lavanderia

Fonte: Mandigan et al. (2010).

3.6. Enzimas microbianas termoestáveis

Micro-organismos capazes de crescer em temperaturas acima de 55°C são chamados micro-organismos termofílicos e são classificados como bactérias ou archae. As enzimas produzidas por estes micro-organismos são conhecidas como termoenzimas ou enzimas termoestáveis (Andrade et al., 1999; Tolner et al., 1997; Vieille e Zeikus, 1996).

As enzimas termoestáveis, de maneira geral, apresentam vantagens para a aplicação na indústria, visto que processos biotecnológicos conduzidos em elevadas temperaturas têm menor risco de contaminação por micro-organismos mesófilos significativamente reduzidos (Haki e Rakshit, 2003). As temperaturas mais elevadas favorecem a solubilidade de substratos e produtos, e aumentam as taxas de reação por redução da viscosidade e por aumento do coeficiente de difusão dos substratos (Egorova e Antranikian, 2005). Adicionalmente, a utilização de temperaturas mais altas faz com que a velocidade da reação seja aumentada, necessitando de uma menor quantidade de enzima, pois um aumento de 10°C na temperatura promove um aumento de aproximadamente duas vezes na velocidade da reação (Nascimento, 2005).

Dentre as enzimas termoestáveis produzidas por micro-organismos, destacam-se: celulases, xilanases, amilases, pectinases e proteases.

3.6.1. Celulases

Na natureza, existe uma grande variedade de micro-organismos que degradam biomassa, principalmente celulose, produzindo diferentes complexos de enzimas (Castro et al., 2010; Lynd et al., 2002). Para a degradação da celulose microcristalina, que é insolúvel em água devido à sua estrutura altamente compacta, é interessante a utilização de celulases termoestáveis (Haki e Rakshit, 2003). Devido a este fato, as celulases termoestáveis de micro-organismos termofílicos passaram a ser mais estudadas e caracterizadas (Maheshwari et al.,

2000).

Celulases são enzimas capazes de atuar sobre materiais celulósicos, promovendo sua hidrólise. Estas enzimas são biocatalisadores altamente específicos que atuam em sinergia para a liberação de açúcares, dos quais glicose é o que desperta maior interesse industrial, devido à possibilidade de sua conversão em produtos de maior valor agregado (Castro et. al., 2010).

Na hidrólise estão envolvidos três principais grupos de enzimas: β -1,4-endoglucanase (EC 3.2.1.4), β -1,4-exoglucanase, que são representadas pelas celobioidrolases (EC 3.2.1.91) e glucanohidrolases (EC 3.2.1.74) e o grupo representado pelas β -1,4-glicosidases (EC 3.2.1.21) (Lynd et al., 2002). As carboximetilcelulases (β -1,4- endoglucanase) clivam as ligações das regiões menos compactadas (amorfa) da celulose, diminuindo o comprimento da fibra e gerando novas extremidades livres. Já as avicelases (exoglicanases) agem de maneira progressiva em extremidades redutoras ou não-redutoras da celulose, com maior afinidade por celulose insolúvel ou microcristalina, liberando glicose e principalmente celobiose como produtos. Por outro lado, as β -glicosidases atuam nos resíduos de celobiose liberados e hidrolisam a glicose (Howard et al., 2003; Lee et al., 2003; Lynd et al., 2002; Zeilinger et al., 2000).

A pesquisa por celulases termoestáveis tem se intensificado nos últimos anos e o domínio *Archae* tem sido pesquisado com maior ênfase. Genes codificadores de enzimas celulásicas de micro-organismos termófilos degradadores de celulose, foram clonados e, as enzimas correspondentes purificadas e caracterizadas (Niehaus et al., 1999). Entre os micro-organismos do domínio *Archae*, incluem-se *Pyrococcus furiosus* e *Pyrococcus horikoshi*, espécies do gênero *Sulfolobus* como produtores de β -glicosidases e o gênero *Thermotoga*, com suas endoglicanases e exoglicanases sendo purificadas e caracterizadas (Haki e Rakshit, 2003; Niehaus et al., 1999).

Além de serem novas opções para a produção de celulases termoestáveis, os micro-organismos termofílicos, sintetizam celulases resistentes a valores de pH alcalino e ácido. Também conseguem desenvolver-se em uma variedade de substratos com menores riscos de contaminação por outros micro-organismos. Makky (2009) investigou a produção de celulases (avicelase) pelo termofílico *Geobacillus stearothermophilus* quando cultivado no bagaço de cana-de-açúcar. Esta enzima apresentou pH e temperatura ótimas para atividade a 7,0 e 50°C,

respectivamente. Além disso, mostrou boa estabilidade entre temperaturas variando de 30-80°C.

A temperatura e o pH para a atividade ótima da enzima carboximetilcelulase produzida por *Bacillus* sp VGI foi 65°C e 9-10, respectivamente (Singh et al., 2001). Para a cepa *Bacillus* ferm bp-3431, foi 55°C (Saito et al., 1994) a pH 9,5-10,5, 45°C para *Bacillus* sp. KSM-S237 a pH 8,6–9,0 (Hakamada et al., 1997) e 40°C para *Bacillus* sp. CBS 670.93 a pH 6–10 (Van Solingen 1999). Em relação à estabilidade térmica, a carboximetilcelulase de *Bacillus* sp. VGI apresentou uma meia vida de 720 min a 60°C, 420 min a 70°C, 180 min a 80°C, 70 min a 90°C e 12 min a 100°C. Além disso, mais de 75% de atividade foi retida até mesmo após 6 horas de incubação a 60°C entre valores de pH de 7 a 10.

As celulasas são enzimas industrialmente importantes e são comercializadas em grandes volumes (Singhania et al., 2010) para utilização em diferentes aplicações industriais (Karmakar et al., 2011; Shi et al., 2011) como: extração de proteína de soja, óleos essenciais, aromatizantes, utilização na indústria têxtil, no mercado de detergentes, na indústria de alimentos, na indústria de polpa e de papel, no tratamento de resíduos e na produção de bioetanol de segunda geração (Castro e Pereira Jr., 2010; Vasconcelos e Cavaco-Paulo, 2006; Peixoto, 2006; Zhang et al., 2006).

Celulasas produzidas pela bactéria termofílica e celulolítica *Anoxybacillus* sp. 527 demonstraram alta atividade entre temperaturas de 50 a 70°C com máxima atividade a 70°C. Embora as atividades tenham reduzido drasticamente a 80°C, 25% do potencial máximo celulolítico foi ainda retido até mesmo a 100°C, tornando estas enzimas muito promissoras para a engenharia genética de proteínas, a fim de melhorar sua tolerância para a degradação de celulose a altas temperaturas (Liang et al., 2010).

O uso das celulasas tem sido explorado no âmbito da utilização da enzima purificada em produtos comercializados, extrato bruto ou com o próprio micro-organismo na sua forma latente, a escolha depende da aplicação. Na indústria de detergentes se emprega a enzima parcialmente purificada e com atividade em condições alcalinas. Já no caso de tratamento de efluentes da indústria de papel, a aplicação direta do micro-organismo tem demonstrado resultados satisfatórios, além de um custo menor (De Marco, 2012).

3.6.2. Xilanases

A xilana é o mais abundante polissacarídeo não celulósico renovável da terra. É um dos principais constituintes da parede celular das plantas e constitui cerca de 20-30% do peso seco da madeira de plantas tropicais. Estudos revelam que a xilana forma uma interfase entre a lignina e outros polissacarídeos. Ela está presente principalmente no secundário da parede da célula e ligada de forma covalente com resíduos fenólicos de lignina e outros polissacáridos tais como pectinas e glucanos (Dhiman et al., 2008).

As xilanases são enzimas que catabolizam os resíduos xilano. Ao longo dos anos o uso de xilanase em nível industrial aumentou significativamente (Dhiman et al., 2008, Haki and Rakshit, 2003; Techapun et al., 2003).

As endo β 1,4 xilanases (EC 3.2.1.8) são enzimas extracelulares, produzidas principalmente por bactérias e fungos, que fazem a hidrólise das ligações β 1,4 na xilana principalmente. A xilana é composta por resíduos de β -xilopiranosose, unidos por ligações β 1,4, com graus variáveis de substituições em suas cadeias laterais. Os produtos da hidrólise das xilanases são constituídos de monômeros D-xilose e xilo-oligossacarídeos de diferentes tamanhos (Santos e Ishii, 2011; Jänis, 2007; Heck, 2006).

As xilanases são encontradas em bactérias terrestres e marinhas, em bactérias presentes no sistema digestivo de ruminantes, fungos, algas marinhas, protozoários, caracóis, crustáceos, insetos e sementes de plantas terrestres. No entanto, xilanases comerciais podem ser obtidas a partir de bactérias, como por exemplo, de *Bacillus* sp. Pesquisas têm demonstrado que a biossíntese de xilanase é induzida por xilana, xilose, xilobiose ou ainda vários resíduos de β -D-xilopiranosil adicionados ao meio de cultura durante o crescimento microbiano, por outro lado, a repressão catabólica por glicose é um fenômeno comum observado na biossíntese de xilanases (Nagar et al., 2011; Girio et al., 2010).

A procura por novas cepas de micro-organismos produtores de xilanases com melhores características fisiológicas em relação à temperatura, ao pH do meio, à maior variedade de fermentação do substrato, à resistência e adaptabilidade à toxicidade de substratos de baixo custo ainda é necessária, levando em consideração a grande biodiversidade existente (Kumar et al., 2012; Girio et al., 2010). Cordeiro et al. (2002) realizaram estudos sobre o potencial da

produção de xilanases por *Bacillus* sp. utilizando como substrato a xilana. Verificaram que a enzima apresentou temperatura ótima de 90°C e pH entre 6,5-7,0, além de se apresentar estável em temperaturas entre 30-100°C e pH na faixa de 5,5-8,5.

As enzimas que degradam a xilana possuem um grande potencial em várias aplicações na área da biotecnologia. As xilanases estão envolvidas na bioconversão da xilana, presente em grandes quantidades em resíduos agrícolas e em resíduos provenientes de indústrias alimentícias, em xilose, o qual age como substrato na obtenção de etanol, por processos fermentativos, (Chandrakant e Bisaria, 2000) e em xilitol, utilizado como adoçante em vários tipos de alimentos (Parajó et al., 2004).

Xilanases também são usadas na indústria de alimentos como panificação, indústrias de sucos e vinho, bem como na fabricação de papel e ração animal (Girio et al., 2010), além de sua utilização na extração de café, formulação de detergentes e na produção de polissacarídeos com atividade farmacológica para o uso como agentes antimicrobianos e/ou antioxidantes (Collins et al., 2005).

3.6.3. Amilases

As amilases, tanto no grupo dos eucariotos como no grupo dos procariotos, atuam como uma das principais enzimas responsáveis pela obtenção de energia para as funções metabólicas, a partir do amido como fonte de carbono. Porém, na maioria dos eucariotos, estas enzimas atuam em tecidos ou órgãos específicos, relacionados à nutrição do organismo, o que inviabiliza, na maioria dos casos, a sua extração e purificação para o uso comercial (Joo e Chang, 2005). Assim, os micro-organismos termofílicos surgem como uma alternativa simples e barata para a produção dessas enzimas, uma vez que requerem condições muitas vezes mínimas de nutrição e de manutenção, apresentam alta eficiência na produção, além de secretarem as enzimas para o meio extracelular (Sajedi et al., 2005).

As enzimas de maior importância na hidrólise do amido são (Antranikian et al., 1991; Vihinem e Mantsala, 1989): α -amilases (E.C.3.2.1.1 1,4- α -D-glucano glucanohidrolase) - correspondem a endoamilases, que atuam ao acaso ao longo das cadeias de amilose e amilopectina hidrolisando as ligações α -1,4 liberando maltose, glicose e dextrina. São produzidas, principalmente, por bactérias do

gênero *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Lactobacillus*, e por fungos como os *Aspergillus*; β -amilases (E.C.3.2.1.2 1,4- α -D-glucano maltohidrolase) - exoenzimas que hidrolisam a penúltima ligação α -1,4 a partir da extremidade não redutora da molécula liberando maltose, não sendo capazes de hidrolisar ligações α -1,6 dos substratos ramificados. São produzidas por algumas espécies de *Bacillus* e *Clostridium thermosulfurogenes* com características termoestáveis; Glicoamilases (E.C.3.2.1.3 1,4- α -D-glucano glicohidrolase) - são exoamilases que produzem β -D-glicose a partir da extremidade não-redutora da cadeia de amilose, amilopectina e glicogênio por meio da hidrólise das ligações glicosídicas α -1,4 removendo sucessivas unidades de glicose. Pululanases (E.C.3.2.1.41 pullulan 6-glicohidrolase) - são enzimas desramificantes que quebram as ligações α -1,6 do pululano, um polissacarídeo linear que consiste de maltotrioses unidas por ligações glicosídicas α -1,6 e que não pode ser degradado por α ou β -amilase.

As α -amilases secretadas por bactérias são mais termoestáveis que as de origem fúngica. Entre as bacterianas, aquelas secretadas pelo gênero *Bacillus* são as mais termoestáveis, aumentando ainda mais a sua aplicabilidade industrial. As α -amilases produzidas por várias espécies de *Bacillus* diferem entre si quanto à faixa ótima de pH, temperatura, estabilidade da enzima, além de outros fatores fisiológicos inerentes a cada espécie. Portanto, as enzimas de diferentes origens têm aplicabilidades específicas em diferentes setores (Chandra et al., 1980).

Uma grande variedade de micro-organismos produz um ou mais tipos de amilases. Sabe-se que as amilases produzidas por micro-organismos termofílicos apresentam características mais termoestáveis do que as produzidas pelos micro-organismos mesofílicos. Essas amilases termoestáveis são de grande interesse na indústria de processamento do amido, uma vez que a temperatura de gelatinização do mesmo fica em torno dos 70°C (Goyal et al., 2005; Sarikaya, et al., 2000).

Inúmeros trabalhos têm reportado a produção de amilases por micro-organismos termofílicos. Campbell (1995) isolou e purificou α -amilase produzida pelo *Bacillus coagulans*. Esta enzima mantém 90% da sua atividade após uma hora a 90°C. Hartman et al. (1995), verificaram que α -amilase de *Bacillus stearothermophilus* permaneceu ativa após 12 horas a 90°C. A enzima produzida por este micro-organismo é mais termoestável do que a secretada pelo *Bacillus*

subtilis. Amilase de *Bacillus* sp. PN5 teve sua atividade evidenciada a 90°C. Após 6 horas de incubação nesta mesma temperatura a enzima ainda exibia 90% de atividade (Saxena et al., 2007).

As amilases, principalmente a α -amilase, apresentam amplo espectro de aplicações industriais como na indústria de alimentos, para a obtenção de xaropes ricos em glicose e frutose que, posteriormente, são utilizados como adoçantes em refrigerantes; panificação, onde melhoram as características sensoriais do produto; têxtil, para degradar o amido que é aplicado nos fios protegendo-os de danos estruturais durante a tecelagem; papel, na remoção da camada de amido utilizada para proteção do mesmo contra danos mecânicos durante o processamento e também nas etapas de finalização da sua produção; detergentes, na remoção de manchas amiláceas (Gupta et al., 2003; Kirk et al., 2002).

A produção industrial de glicose tem início com a liquefação do amido, geralmente realizada em dois passos: um primeiro estágio de 5 a 15 minutos a 105-107°C, seguido de um segundo estágio de 60 a 80 minutos a 95-98°C, em concentrações de amido de no máximo 38% e pH com valores entre 5,8 e 6,2. As α -amilases termoestáveis, derivadas geralmente de *Bacillus licheniformis* e *Bacillus stearothermophilus*, são adicionadas ao processo gerando, ao final da liquefação, um hidrolisado claro e negativo ao teste com iodo (Brumm, 1998).

Existem amilases que além de serem termoestáveis, são estáveis a pH alcalinos e outras que são estáveis a pH ácidos. Tanto as amilases alcalinas quanto as amilases acidófilas possuem aplicabilidade industrial (Asoodeh et al., 2010). Um dos usos das amilases alcalinas é como aditivo em detergentes usados em processos de lavagem, uma vez que esses processos são geralmente realizados sob pH alcalino, em água quente ou fria (Asoodeh et al., 2010). As amilases acidófilas são usadas na indústria de processamento de alimentos, principalmente na indústria de amido, onde o pH natural da suspensão de amido é geralmente em torno de 4,5 (Sivaramakrishnan et al., 2006; Goyal et al., 2005; Sarikaya et al., 2000).

3.6.4. Pectinases

As pectinases são responsáveis pela degradação de pectina, uma molécula complexa, constituída basicamente por polissacarídeos estruturais parcialmente metoxilados, os quais estão presentes em todos os tecidos vegetais jovens. Estas enzimas possuem várias aplicações biotecnológicas, sendo consideradas como destaque no setor industrial. Assim, encontram aplicação na extração e clarificação de sucos de frutas e vinhos, na extração de óleos essenciais, na produção de alimentos para recém-nascidos, na fermentação do café e cacau, além de outras, como na indústria têxtil, especialmente no tratamento de fibras como o linho e o ramie (Ustok et al., 2007).

A pectina desmetoxilada é chamada de ácido poligalacturônico ou ácido péctico. Micro-organismos podem degradar a pectina diretamente, por clivagem em oligômeros metoxilados, ou após desmetoxilação da pectina, ou mesmo, pela ação da enzima pectinaesterease (EC 3.1.1.11). A clivagem direta da pectina ou do ácido poligalacturônico pode ocorrer por hidrólise ou ação transeliminativa (Sharma e Satyanarayana, 2006).

A classificação das enzimas pécticas envolve dois grupos: a) aquelas que promovem a despolimerização das ligações glicosídicas do polímero péctico por hidrólises (hidrolases) ou por ação transeliminativa (liases), e b) as que promovem a saponificação das substâncias pécticas (pectinaesterases). As hidrolases são denominadas poligalacturonases e são subdivididas, quanto ao mecanismo de ação sobre a cadeia de pectato, em endopoligalacturonases (endo-PG) ou poli (α -1,4-D-galacturonato) glicano-hidrolase (EC 3.2.1.15), as quais produzem uma série de oligogalacturonatos, tais como, mono, di, tri, e os tetragalacturonatos e exopoligalacturonases (exo-PG), classificados como poli (α -1,4-Dgalacturonato) galacturono-hidrolase (EC 3.2.1.87), que atuam nas extremidades da cadeia de pectato (Jayani et al., 2005).

Comparativamente com outras enzimas, poucos trabalhos têm sido reportados sobre a produção de pectinases por via biotecnológica. Destes, a maior parte envolve a produção de pectinases por micro-organismos mesofílicos (Ali e Brady, 1982). Entretanto, enzimas de micro-organismos termofílicos têm recebido considerável atenção da indústria por causa de suas características especiais, como estabilidade térmica e as altas mudanças de pH.

A produção de poligalacturonases pelo termofílico *Bacillus* sp SMIA-2 cultivado em meio líquido contendo pectina cítrica foi estudada por Cordeiro e Martins (2009). A temperatura ótima desta enzima foi 70°C. A enzima manteve 62% e 58% de sua atividade máxima quando incubada por 2 horas a 40 e 90°C, respectivamente. O pH ótimo para atividade da enzima foi 7,0. A enzima manteve 90% e 75% de sua atividade máxima quando incubada a pH 8,0 e 8,5, respectivamente, por 24 horas, à temperatura ambiente.

Temperaturas ótimas de 60°C foram relatadas para pectinases de *Bacillus* sp. MG-cp-2 (Kapoor e Kuhad, 2002) e *Streptomyces* sp. QG-11-3 (Beg et al., 2001), enquanto que temperaturas ótimas mais baixas entre 45°C e 50°C foram relatadas para pectinases de *Sclerotinia sclerotiorum* (Riou et al., 1992) e *Saccharomyces cerevisiae* (Blanco et al. 1999), respectivamente.

A aplicação comercial das pectinases iniciou por volta de 1930 com a preparação de vinhos e sucos de frutas. Porém, apenas na década de 60, a composição química dos tecidos de plantas foi elucidada e com esse conhecimento, cientistas começaram a estudar e aplicar essas enzimas com maior eficiência. Como resultado, pectinases são as enzimas que mais crescem no setor comercial, sendo produzidas principalmente por bactérias, fungos e leveduras (Ortega et al., 2004).

Na extração de sucos de uva para produção de vinhos, a fruta macerada é submetida a um tratamento térmico de 80°C para desnaturar oxidases que causam perda da cor do vinho durante a estocagem. Na extração do "pulp wash", a polpa da laranja resultante do peneiramento do suco de primeira, é aquecida a 90°C para desnaturar a pectina esterase da fruta, que causa problemas de coagulação da pectina. Além da desnaturação das enzimas, o tratamento térmico tem por finalidade a pasteurização dos sucos e mostos, a fim de reduzir microflora contaminante, principalmente de leveduras. Em todos esses processos citados, o material submetido ao aquecimento precisa ser posteriormente resfriado a 50 °C para tratamento com pectinases comerciais, as quais são termolábeis. O uso de pectinases termoestáveis evitaria a etapa de resfriamento, reduzindo tempo e custo dos processos (Gomes et al., 2007).

A utilização de enzimas termoestáveis como a poligalacturonase em diversos processos industriais é vantajosa, porque altas temperaturas podem ser empregadas no processo com a conseqüente redução do risco de contaminação

microbiana, a maior parte dos reagentes torna-se mais solúvel difundindo-se mais rapidamente e assim permitindo que concentrações maiores destes compostos possam ser usadas, aumento da taxa de transferência e aumento da solubilidade dos substratos e outros (Wang et al., 2007).

3.6.5. Proteases

Proteases são enzimas envolvidas na conversão de proteínas em aminoácidos e peptídeos. A sua produção é uma propriedade pertencente a todos os organismos e são geralmente constitutivas, embora com o tempo, passam a ser parcialmente induzidas (Beg *et al.*, 2002). Kumar e Takagi (1999) citam as proteases como sendo constituintes essenciais em todas as formas de vida na terra, incluindo os procariotos, os fungos, as plantas e os animais.

Segundo Rao et al. (1998), as proteases são classificadas em dois grupos principais, que são as exopeptidases e endopeptidases ou proteinases, dependendo do sítio de ação dessas enzimas na proteína. As exopeptidases iniciam o processo de degradação a partir das extremidades amino (N) ou carboxi-terminal (C) das proteínas, produzindo pequenos peptídeos ou mesmo aminoácidos. As endopeptidases clivam a proteína alvo na sua parte interna, longe das extremidades amino e carboxi-terminal, gerando dessa forma, peptídeos maiores. Baseado no tipo do grupo funcional presente no sítio catalítico da enzima, as carboxipeptidases foram subdivididas em serina, metalo, e cisteína-carboxipeptidases e as endopeptidases são ainda classificadas em quatro relevantes grupos, que são: serina, cisteína, aspártico e metalo proteases. Sendo que as serina peptidases possuem um resíduo de serina em seu centro ativo, enquanto as aspártico peptidases têm duas unidades de ácido aspártico no seu centro catalítico. Cisteína-proteases apresentam um aminoácido cisteína e as metaloproteases usam um íon metal no seu mecanismo catalítico.

As proteases constituem um dos mais importantes grupos de enzimas industriais com aplicações em diferentes indústrias em todo o mundo (Rao et al., 1998). As proteases alcalinas têm sido intensamente estudadas devido à possibilidade de uso em diversos ramos industriais tais como nas indústrias de alimentos, farmacêutica, couro, detergente, diagnósticos, manejo de resíduos e de recuperação de prata usada em filmes de raios-X (Genckal e Tari, 2006).

Os micro-organismos contribuem com dois terços da produção de proteases comercializadas no mundo. Existe uma longa lista de micro-organismos produtores de proteases, porém um pequeno número é explorado comercialmente devido ao fato de alguns possuírem características tóxicas e patogênicas. Um grande número de bactérias, fungos e leveduras é conhecido por produzir proteases alcalinas do tipo serina (Ladeira, 2009; Kumar e Takagi, 1999; Moon e Parulekar, 1992). Porém, poucos micro-organismos foram reconhecidos como produtores comerciais, sendo somente os micro-organismos que produzem quantidades substanciais de enzimas extracelulares os de maior importância industrial (Gupta et al., 2002a; Gupta et al., 2002b). Pesquisas conclusivas encontradas na literatura mostram que o gênero *Bacillus sp.* é significativamente a maior fonte comercial de proteases. Esse fato deve-se a uma relativa facilidade de isolamento dos micro-organismos desse gênero em diversas fontes, fazendo deles um foco de atenção na biotecnologia (Johnevelsy e Naik, 2001). Na tabela 6 encontram-se as principais aplicações industriais de proteases microbianas.

Tabela 6: Aplicações industriais de proteases microbianas

Fonte	Enzima	Aplicação Industrial
<i>Aspergillus niger</i>	Proteases ácidas e neutras	Queijo, carnes, pescado, cereais, bebidas.
<i>Aspergillus oryzae</i>	Proteases ácidas e neutras	Hidrólise proteica, processamento de carne e pescado, indústria cervejeira e de panificação.
<i>Aspergillus melleus</i>	Proteases alcalinas	Manufatura de queijo (coagulação do leite).
<i>Bacillus licheniformis</i> e <i>Bacillus subtilis</i>	Proteases alcalinas	Fabricação de detergentes e indústria de couro, processamento de carnes, pescados e derivados lácteos.
<i>Bacillus subtilis</i> e <i>Bacillus cereus</i>	Protease neutra	Produção de bebidas e panificação.

Fonte: Wiseman (1985).

Uma grande quantidade de espécies de *Bacillus* de ambientes exóticos foi explorada para a produção de proteases, podem ser citados como produtores potenciais *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. amyloliquifaciens* e *B. mojanensis* (Gupta et al., 2002a; Gupta et al., 2002b). Sendo assim, o gênero *Bacillus* contém um grande número de espécies industrialmente importantes e fornece, aproximadamente, a metade da produção comercial atual de enzimas.

De acordo com Kumar e Takagi (1999), para a utilização de uma protease em detergentes, elas devem preencher alguns requisitos como possuir elevada atividade e estabilidade em uma ampla faixa de pH e temperatura, além de serem efetivas em baixas concentrações (0,4-0,8%) e serem compatíveis com vários detergentes comerciais e agentes oxidantes e sequestrantes usados em sua formulação. Algumas condições de limpeza são menos drásticas que outras, como é o caso de soluções de limpeza de lentes de contato, que não requerem a estabilidade térmica das enzimas empregadas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Micro-organismo

A cepa da bactéria utilizada neste estudo foi um termofílico *Bacillus* sp. SMIA-2, anteriormente isolada a partir de uma amostra coletada de solo na cidade de Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil (Souza e Martins, 2001). As culturas foram estocadas em glicerol 20% (v/v) a -20°C em ultrafreezer.

4.2. Meio de cultura

O meio de cultura utilizado neste trabalho para produção das enzimas era composto (g.L^{-1} de água destilada) por: farinha da casca de maracujá comercial (FCM) – 5,0; água de maceração de milho (AMM) - 5,0; Peptona - 1,0; KCl - 0,3; MgSO_4 - 0,5; K_2HPO_4 - 0,87; CaCl_2 - 0,29; ZnO - $2,03 \times 10^{-3}$; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - $2,7 \times 10^{-2}$; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ - $1,0 \times 10^{-2}$; $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - $8,5 \times 10^{-4}$; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - $2,4 \times 10^{-3}$; $\text{NiCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - $2,5 \times 10^{-4}$ e H_3BO_3 - $3,0 \times 10^{-4}$. O pH final do meio foi variável de 7,5 - 8,5 e ajustado com NaOH 1,0M. Posteriormente o meio de cultivo foi esterilizado por autoclave a vapor a 121°C , 1 atm durante 15 minutos.

4.3. Ativação da linhagem e preparo do inóculo

O micro-organismo foi estriado em placas de Petri contendo meio TSY (g.L^{-1} de água destilada): triptona-20; NaCl-10; extrato de levedura-10 e ágar-20. As placas foram incubadas em estufa QUIMIS modelo Q 315 D26 a 50°C por 18

horas. Após este período, 5 mL do meio de cultura descrito acima foram transferidos para as placas para ressuspender as células que foram posteriormente sugadas com o auxílio de uma pipeta estéril. Estas células foram inoculadas em frascos erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL do respectivo meio de crescimento, incubadas por mais 18 horas a 50°C em incubadora “shaker rotatório” (Thermo Forma Orbital Shaker, Ohio, EUA) operando a 150 rpm. Este meio foi denominado inóculo.

4.4. Otimização das condições do meio de cultivo por planejamento experimental

A otimização das condições do meio de cultivo foi elaborada seguindo a técnica de planejamento fatorial em dois níveis (2^2), em relação às variáveis independentes, ao pH inicial do meio de cultura e à concentração de farinha da casca do maracujá, com três repetições do ponto central, totalizando 7 experimentos (Neto et al., 2001), durante 72 horas de fermentação à temperatura de 50°C e 150 rpm.

Os níveis das variáveis independentes em estudo foram definidos em testes preliminares e seguem apresentados na Tabela 7, juntamente com as condições experimentais.

A análise estatística dos dados obtidos das condições do meio de cultivo seguiu a metodologia de superfície de resposta utilizando o programa Statistica, versão 7.0. As respostas avaliadas foram crescimento celular (DO 600nm), pH final e na produção das enzimas Protease (U/mL), Amilase (U/mL), Poligalacutoronase (U/mL), Xilanase (U/mL) e Avicelase (U/mL).

Tabela 7: Representação do planejamento experimental com os níveis das variáveis independentes: pH inicial do meio de cultura e concentração de farinha da casca do maracujá

Ensaio	Variáveis independentes			
	Valores Codificados		Valores Reais	
	Concentração de farinha da casca do maracujá	pH inicial do meio de cultivo	Concentração de farinha da casca do maracujá (%)	pH inicial do meio de cultivo
1	-1	-1	0,25	7,5
2	-1	1	0,25	8,5
3	1	-1	0,75	7,5
4	1	1	0,75	8,5
5	0	0	0,5	8,0
6	0	0	0,5	8,0
7	0	0	0,5	8,0

4.5. Condições da fermentação

O meio de cultura (50 mL em frascos Erlenmeyer de 250 mL) foi inoculado com 2 mL do inóculo (número inicial de células por mL de 10^4) e incubado a 50°C em um agitador orbital (Thermo Forma, Ohio, EUA), operando a 150 rpm durante 129 horas.

4.6. Determinação do crescimento celular por densidade ótica

O crescimento celular foi determinado, após períodos predeterminados de fermentação, em função da densidade ótica a 600 nm, utilizando-se um espectrofotômetro Shimadzu modelo UVmini-1240 (Kyoto, Japão).

4.7. Determinação do crescimento celular por contagem de colônias

Em períodos predeterminados foi realizada a contagem de células microbianas. A contagem de células foi realizada pela contagem das colônias em

placas e expressa em UFC/mL (Unidades Formadoras de Colônias por mililitros).

4.8. Obtenção das enzimas

Alíquotas do meio de cultivo foram retiradas em intervalos predeterminados, centrifugadas a 5.000g por 15 minutos a 4°C em uma centrífuga da marca HERMLEZ 382K-a para obtenção do sobrenadante isento de células (extrato bruto), que será utilizado para dosagem da atividade enzimática.

4.9. Purificação parcial do complexo enzimático

Para a purificação parcial das enzimas, o sobrenadante livre de células foi adicionado de NH_4SO_4 em 60% de saturação e após 18 horas de repouso a 4°C, foi novamente centrifugado a 9000g por 30 minutos a 4°C. Em seguida o precipitado formado foi dissolvido em tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, e realizada a diálise em membrana contra o mesmo tampão a 4°C por 18 horas.

4.10. Ensaio enzimáticos

4.10.1. Celulases

4.10.1.1. Avicelase

A atividade da enzima avicelase (EC 3.2.1.91) foi medida pela quantificação da liberação de açúcares redutores da hidrólise de celulose microcristalina “avicel” (PH-101, Sigma-cell 20) (Ghose, 1987). A mistura de reação que continha 0,5 ml de solução de substrato (avicel) (1%, p/v) preparado em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,5, e 0,5 mL do extrato enzimático foi incubada a 70°C em banho-maria. A enzima e os ensaios em branco também foram simultaneamente incubados com amostras de teste. Após 10 minutos de reação, 1 mL de ácido dinitrossalicílico (DNS) foi adicionado e deixado em ebulição em banho-maria durante 5 minutos. A reação foi paralisada pela imersão dos tubos em banho de gelo. A coloração desenvolvida foi medida em espectrofotômetro modelo SHIMADZU UV-mini 1240 a 540 nm (Miller, 1959). Uma unidade (U) de

atividade de avicelase foi definida como 1 μ mol de glicose equivalente liberado por minuto sob as condições de ensaio acima descritas, usando uma curva padrão de glicose.

4.10.1.2. CMCase

A atividade da enzima carboximetilcelulase (EC 3.2.1.4) foi medida por meio da quantificação da liberação de açúcares redutores da hidrólise de carboximetilcelulose (Sigma) (Ghose, 1987). A mistura de reação que continha 0,5 mL de solução de substrato “carboximetilcelulose” (1%, p/v) preparado em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 9,0, e 0,5 mL de solução de enzima foi incubada a 70°C em banho-maria. A enzima e os ensaios em branco também foram simultaneamente incubados com amostras de teste. Após 10 minutos de reação, 1 mL de ácido dinitrossalicílico (DNS) foi adicionado e deixado em ebulição em banho-maria durante 5 minutos para paralisar a reação. As amostras resultantes foram em seguida resfriadas em banho de gelo por 5 minutos. A coloração desenvolvida foi medida por espectrofotômetro modelo SHIMADZU UV-mini 1240 a 540 nm (Miller, 1959). Uma unidade (U) de atividade de CMCase foi definida como 1 μ mol de glicose equivalente liberado por minuto sob as condições de ensaio acima descritas, usando uma curva padrão de glicose.

4.10.3. α -amilase

A atividade amilolítica do micro-organismo foi determinada segundo a metodologia do ácido 3,5-dinitrossalicílico ou Reagente de Miller (DNS) (Miller, 1959) que determina o incremento dos açúcares redutores na solução como resultado da ação da α -amilase sobre o amido. A reação continha 0,5 mL do extrato enzimático, 0,5 mL da solução de amido em 0,5% preparada em tampão Tris-HCl 0,05 M (pH 8,5) e 0,2 mL do mesmo tampão. Esta mistura foi incubada em banho-maria a 90°C por 10 minutos. Em seguida, a reação foi paralisada pela adição de 1 mL da solução de DNS (Miller, 1959) à mistura. Em seguida esta mistura foi colocada em água em ebulição durante 10 minutos. Transcorrido este tempo, as amostras foram resfriadas em banho de gelo durante 5 minutos e adicionadas de 4,8 mL de água destilada.

A coloração desenvolvida foi determinada com espectrofotômetro modelo SHIMADZU UV-mini 1240, utilizando-se o comprimento de onda de 540 nm. O mesmo procedimento foi realizado com o controle, exceto que o DNS foi adicionado antes do sobrenadante à solução de amido 0,5% e 0,2 mL de Tampão Tris-HCl 0,05 M (pH 8,5) e todas as análises foram realizadas em triplicata. O teor de açúcares redutores foi determinado por meio de uma curva de glicose. Uma unidade de atividade da amilase foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de açúcares redutores por minuto por mL da enzima a partir do amido solúvel nas condições do ensaio.

4.10.4. Xilanase

A atividade da enzima endo- β -1,4-xilanase (EC 3.2.1.8) foi medida pela quantificação da liberação de açúcares redutores da hidrólise de xilana Oalt Spelts (Sigma). A mistura de reação que continha 0,5 ml de solução de substrato 1% (m/v) preparado em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,5, e 0,5 mL de solução de enzima foi incubada a 70°C. Após 10 min de reação, 1 mL de ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) foi adicionado e deixado em ebulição em banho-maria durante 5 min para paralisar a reação. As amostras resultantes foram em seguida resfriadas em banho de gelo, e a absorvância foi medida a 540 nm (Miller, 1959). Uma unidade (U) de atividade de xilanase foi definida como 1 μmol de xilose equivalente liberado por minuto sob as condições de ensaio acima referidas, usando uma curva padrão de xilose.

4.10.5. Poligalacturonase (Pectinase)

A atividade da poligalacturonase foi determinada em triplicata nos filtrados da cultura, incubando 0,2 mL da enzima bruta com 0,8 mL de solução de pectina cítrica em 0,5% dissolvida em tampão Glicina-NaOH (50 mM, pH 10,0) e incubada a 70°C por 10 minutos (Soares et al., 1999). Após a reação, 1 mL de ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) foi adicionado e deixado em ebulição em banho-maria durante 5 min para paralisar a reação. As amostras resultantes foram em seguida resfriadas em banho de gelo, e a absorvância foi medida a 540 nm (Miller, 1959).

A coloração desenvolvida foi medida por meio de espectrofotômetro

SHIMADZU UV-mini 1240, utilizando comprimento de onda de 540 nm. Uma unidade (U) de atividade da poligalacturonase foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μ mol de ácido galacturônico por minuto a partir da pectina cítrica nas condições do ensaio.

4.10.6. Protease

Alíquotas do meio de cultura foram centrifugadas a 4.500 g por 15 minutos a 4°C (HERMLE Z382K) e o sobrenadante livre de células foi utilizado para dosagem da atividade da enzima. A atividade de proteases foi determinada em triplicata nos filtrados da cultura, adicionando-se 0,5 mL do extrato enzimático bruto em 1 mL de substrato contendo azocaseína 0,2% dissolvida em tampão Tris-HCL 0,2 M (pH 8,5) a 70°C por 10 minutos. A reação foi paralisada com a adição de 0,5 mL de ácido tricloroacético 15% à mistura que foi em seguida centrifugada a 15.000g por 5 minutos a 4°C (HERMLE Z382K). O sobrenadante foi transferido para tubo de ensaio contendo 0,5 mL de solução de NaOH 1,0 M. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir um aumento da absorvância a 420 nm igual a 0,1 em 60 minutos (Janssen et al., 1994). A coloração desenvolvida foi medida por meio de espectrofotômetro SHIMADZU UV-mini 1240, utilizando comprimento de onda de 420 nm. O mesmo procedimento foi realizado com o controle, exceto que o TCA foi adicionado antes do extrato enzimático. Uma unidade de protease foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir um aumento na absorvância, a 420 nm, igual a 0,1 em 60 minutos (Janssen et al., 1994).

4.11. Determinação da proteína

A dosagem de proteína nos filtrados da cultura foi determinada pelo método de Lowry modificado por Peterson (1977), utilizando-se solução de albumina de soro bovino (BSA) como um padrão.

4.12. Efeito da temperatura na atividade e estabilidade das enzimas

O efeito da temperatura sobre a atividade das enzimas foi determinado realizando o procedimento de ensaio padrão a uma faixa de temperatura de 60-95°C. A atividade das enzimas obtida à temperatura ótima foi utilizada para calcular a atividade enzimática relativa percentual em outros valores de temperatura.

A estabilidade térmica das enzimas secretadas por *Bacillus* sp. SMIA-2 foi realizada por determinação da atividade de enzima remanescente após incubação da enzima em banho-maria à temperatura de 50-60°C, por 120 minutos. A atividade residual foi determinada sob condições de pH e temperatura ótima, como descrito acima. A atividade inicial foi assumida como sendo 100% e utilizada para calcular a atividade da enzima como porcentagem da atividade inicial durante o período de incubação.

4.13. Efeito do pH na atividade e estabilidade das enzimas

O pH ótimo das enzimas secretadas por *Bacillus* sp. SMIA-2 foi estimado no intervalo de pH de 7,5-9,5 utilizando tampões de ensaio diferentes. O ensaio das enzimas foi conduzido com o substrato (de acordo com cada enzima estudada) dissolvido em tampões diferentes (Fosfato de sódio: pH 7,0-7,5; Tris-HCl: pH 8,0-9,0 e Bórax-NaOH: pH 9,5-11,0). A atividade das enzimas obtidas no pH ótimo foi utilizada para calcular a atividade das enzimas em termos de porcentagem relativa em relação a outros valores de pH.

O efeito do pH sobre a estabilidade das enzimas foi determinado por meio da pré-incubação do extrato enzimático, sem substrato, a diferentes valores de pH (7,5-9,5) por 120 minutos à temperatura ambiente, e medindo a atividade enzimática residual em condições de ensaio padrão no pH ótimo.

4.14. Utilização das enzimas na remoção de manchas de tecidos

Amostras de tecidos padrão EMPA 112 (TEX CONTROL) sujos com gema de ovo, chocolate e sangue foram utilizados em tamanhos 5 x 5 cm. Os tecidos foram submetidos à lavagem utilizando frascos erlenmeyers de 250mL

contendo o extrato bruto das enzimas (amostras) e água (controle), sob agitação de 150 rpm em “shaker” rotatório TECNAL TE-420. As lavagens foram realizadas em triplicata, a 50°C por 60 minutos. Após a lavagem os tecidos foram enxaguados com água corrente por 1 minuto e secos em estufa a 50°C por 30 minutos. Foi realizado a determinação da densidade ótica (DO 600 nm) e o pH das soluções antes e após a lavagem dos tecidos.

A avaliação do poder de remoção das sujidades foi realizada inicialmente pela medida de cor dos tecidos utilizando o colorímetro de Hunter, (Hunterlab Miniscan Spectrophotometer - HUNTER LAB), escala CIELAB (L*, a*, b*). Na escala de Hunter, o índice “L” mede a luminosidade variando de 0 (para amostra perfeitamente preta – mínima refletância) e 100 (para amostra perfeitamente branca – máxima refletância). O parâmetro a* mede variações na faixa de cor verde (sinal negativo) ao vermelho (sinal positivo) e o parâmetro b* mede variações na faixa de cor azul (sinal negativo) ao amarelo (sinal positivo). As medidas de cor foram expressas em termos de Parâmetro “L” e Chroma $(a^{*2}+b^{*2})^{1/2}$, que é definido como a intensidade de cor. Valores mais baixos do parâmetro Chroma indicam menos intensidade de cor. Portanto, esta escala permite uma comparação de valores de cor e foi usada para avaliar a eficiência das formulações na remoção das sujidades.

4.15. Estabilidade das proteases a oxidantes

A estabilidade das proteases secretadas por *Bacillus* sp. SMIA-2 na presença de oxidantes foi determinada incubando a fração dializada do extrato enzimático a 30°C e 50°C por 30, 60 e 180 minutos na presença de perborato de sódio (0,1 e 0,4%, v/v) e peróxido de hidrogênio (1,5% e 3,0 % v/v). Em seguida, a atividade residual das enzimas foi determinada conforme descrito previamente nos itens 4.10.6 e 4.11. Um controle foi realizado incubando as enzimas na ausência destes compostos nas mesmas condições anteriormente mencionadas.

4.16. Degradação da Lisozima

A fração dializada do extrato enzimático foi incubada à temperatura ambiente com uma solução de lisozima de leite humano (0,25 mg/mL) preparada

em tampão Tris-HCl pH 8,5. Após 60 minutos de incubação os fragmentos das proteínas degradadas foram precipitados com ácido tricloroacético "TCA" 15% (m/v). Após a centrifugação a absorvância do sobrenadante foi determinada a 280 nm utilizando um espectrofotômetro SHIMADZU UV-mini 1240. Esta absorvância foi comparada com a da solução de lisozima que não foi precipitada com TCA (Controle) e a degradação relativa (%) mediada pela protease foi então calculada (Greene et al., 1996).

O efeito do peróxido de hidrogênio no desempenho da protease durante a digestão da lisozima foi também realizada adicionando-se 1,5% (m/v) deste oxidante na mistura contendo a solução de lisozima e a protease.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Crescimento e atividade de celulases, pectinases, xilanases, α -amilases e proteases de *Bacillus* sp. SMIA-2 em culturas submersas contendo farinha da casca de maracujá

A avaliação do potencial do termofílico *Bacillus* sp. SMIA-2 de degradar a farinha da casca de maracujá, um coproduto da indústria processadora de sucos de maracujá, foi realizada cultivando a bactéria em culturas líquidas contendo 0,5% (p/v) deste substrato.

Os resíduos agroindustriais têm sido os substratos mais pesquisados para processos fermentativos, pois são baratos e abundantes, além de apresentarem estrutura polimérica e composição rica em amido, lignocelulose e pectina. Esses materiais orgânicos são fontes de carbono e nitrogênio, atuando como suporte para o crescimento de micro-organismos (Correia, 2004).

Os materiais que fornecem todos os nutrientes necessários ao crescimento celular são considerados substratos ideais. Entretanto, em muitos casos, alguns nutrientes encontram-se em concentrações abaixo da mínima, sendo necessária suplementação do meio. Nesse caso, pode-se incorporar soluções de nutrientes ao substrato, visando adequá-lo melhor às condições nutricionais do micro-organismo para a fermentação desejada (Rocha, 2010).

Neste sentido o meio de cultura contendo farinha da casca de maracujá foi enriquecido com 0,5% (m/m) de água de maceração de milho. Este subproduto da indústria do processamento do amido de milho é uma fonte de carboidratos, aminoácidos, peptídeos, vitaminas, fosfato e íons metálicos (Rivas et al., 2004) e

foi portanto, usado no meio de cultura em substituição ao extrato de levedura e peptona, fontes de nitrogênio de alto custo.

O crescimento do micro-organismo iniciou imediatamente após a incubação do meio de cultura (Figura 1). A fase exponencial de crescimento foi observada durante as primeiras 12 horas de incubação. Após este tempo foi observado que a velocidade de crescimento reduziu e a partir de 36 horas a cultura entrou na fase estacionária (Figura 1).

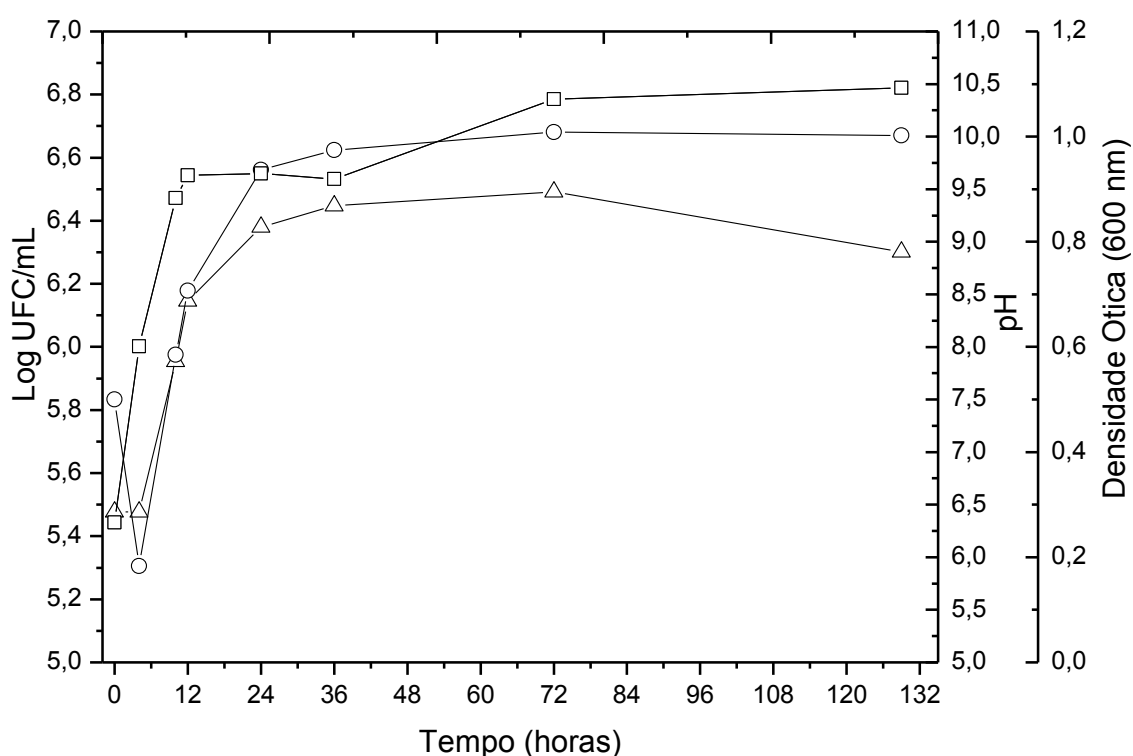


Figura 1: Log UFC/mL (△), Densidade ótica (□) e pH (○) de culturas líquidas de *Bacillus* sp. SMIA-2 contendo farinha da casca de maracujá (0,5%, m/v) e água de maceração de milho (0,5%, m/v) incubadas a 50°C.

O perfil do pH também é mostrado na Figura 1. Observa-se uma queda no pH da cultura de 7,5 para 5,9 durante as primeiras 4 horas de incubação. Entretanto, o pH do meio de cultura aumentou gradativamente para 9,7 depois de 24 horas permanecendo praticamente sem alterações até 129 horas de fermentação. A queda inicial do pH do meio indica que houve a produção de ácidos durante a fase inicial do crescimento bacteriano. Segundo Ming Chu (1992), a acidificação ou alcalinização do meio de cultura reflete o consumo de

substrato. Quando íons amônio estão sendo utilizados, o meio torna-se mais ácido e quando nitrogênio orgânico (aminoácidos e peptídeos) está sendo assimilado, o meio torna-se mais alcalino.

A farinha da casca de maracujá possui nutrientes que foram capazes de suprimir a necessidade de *Bacillus* sp. SMIA-2 para seu crescimento. Estes resultados sugerem que *Bacillus* sp. SMIA-2 secreta enzimas capazes de hidrolisar as macromoléculas presentes neste substrato até atingir a conformação e a solubilidade necessária para que sejam transportadas pela membrana. Entre estas enzimas encontram-se as amilases, pectinases, xilanases, celulases e proteases, importantes para diversos processos com promissoras aplicações industriais (Maller, 2008; Putzke e Putzke, 2002). Deste modo, em intervalos de tempo de 24 horas foram também retiradas amostras para a determinação do perfil enzimático de *Bacillus* sp. SMIA-2.

Os ensaios enzimáticos foram realizados utilizando os filtrados da cultura (extrato livre de células) e avaliaram a sua atividade contra celulose insolúvel (avicel), celulose solúvel (carboximetilcelulose), xilana (xilanase), amido (α -amilase), pectina (poligalacturonase) e azocaseína (protease).

Bacillus sp. SMIA-2 secretou celulases quando cultivado em culturas líquidas contendo a farinha da casca de maracujá. De acordo com Kubicek et al. (1993), as celulases, assim como as demais enzimas extracelulares de hidrólise, são induzidas quando há a necessidade de serem secretadas pelos microorganismos, para que estes cresçam em celulose. A casca de maracujá possui em torno de 80% de polissacarídeos não amiláceos, sendo 42% representado por celulose, 25% substâncias pécticas e 12% hemiceluloses (Yapo e Koffi, 2008).

As celulases produzidas por *Bacillus* sp. SMIA-2 foram capazes de hidrolisar tanto a forma amorfa (carboximetilcelulose - geralmente considerado o substrato para medida da atividade da CMCase) quanto a cristalina (insolúvel-avicel) da celulose. A atividade máxima da CMCase foi obtida após 24 horas de incubação da cultura e após este período os níveis de atividade da enzima decresceram ligeiramente (Figura 2). Por outro lado, a atividade da avicelase (que hidrolisa avicel) aumentou com o período de incubação da cultura alcançando a máxima atividade após 72 horas e então decresceu drasticamente.

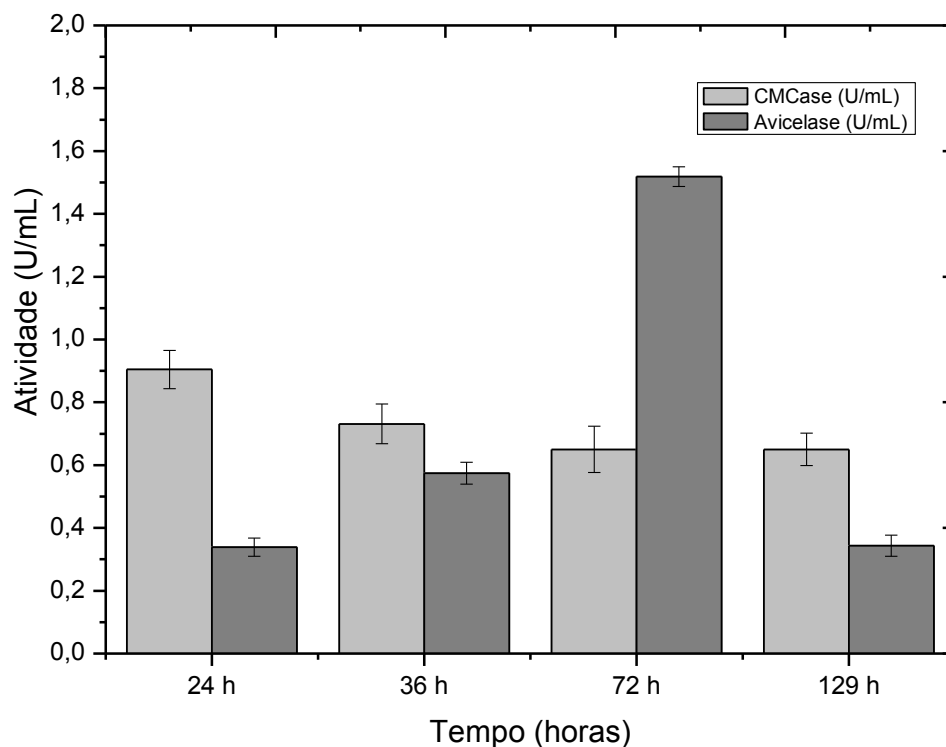


Figura 2: Atividade de celulases de *Bacillus* sp. SMIA-2 em culturas líquidas contendo farinha da casca de maracujá (0,5%, m/v) e água de maceração de milho (0,5%, m/v) incubadas a 50°C.

Estes resultados são similares aos reportados por Ladeira et al. (2015) em que *Bacillus* sp SMIA-2 secretou maiores níveis de atividade de avicelase que CMCCase, quando cultivado em culturas líquidas contendo bagaço de cana. Entretanto, difere que a atividade máxima da CMCCase foi mais tardiamente alcançada que a avicelase. Segundo Kostylev e Wilson (2012), os mecanismos pelos quais diferentes tipos de celulases aumentam cada uma sua atividade são complexos, não completamente entendidos e os dados publicados são frequentemente inconsistentes.

Estudos envolvendo a adsorção de celulases ao substrato (celulose microcristalina) mostraram que, quando comparadas as atividades CMCCase e avicelase, a hidrólise do substrato foi superior na presença das duas enzimas quando comparada a atividade separadamente. Esta interação entre as classes enzimáticas pode resultar em uma maior taxa de hidrólise e explica o sinergismo que ocorre entre elas, e que é necessário na presença de alguns substratos (Ladeira et al., 2015; Kim e Kim, 1992).

As enzimas responsáveis pela hidrólise das substâncias pécicas presentes na casca de maracujá são conhecidas como pectinases, e incluem poligalacturonases, pectina esterases, pectina liases e pectato liase, dependendo do modo de ação (De Vries et al., 2002). A Figura 3 mostra o perfil de atividade da poligalacturonase, nos filtrados da cultura de *Bacillus* sp. SMIA-2.

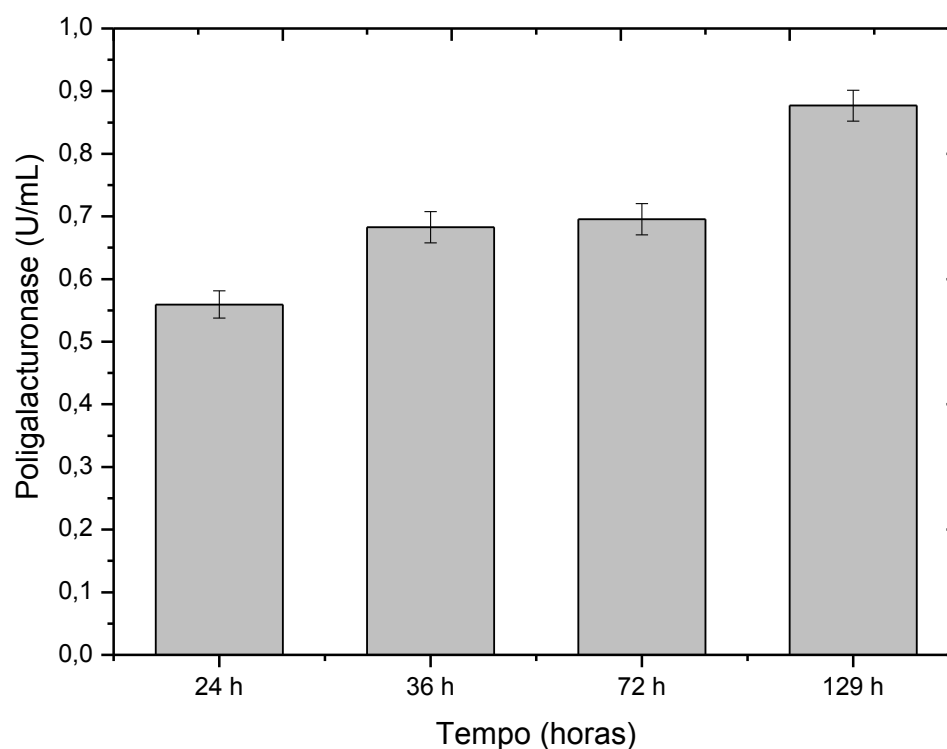


Figura 3: Atividade de poligalacturonases de *Bacillus* sp. SMIA-2 em culturas líquidas contendo farinha da casca de maracujá (0,5%, m/v) e água de maceração de milho (0,5%, m/v) incubadas a 50°C.

Os maiores níveis de atividade da poligalacturonase foram alcançados em 129 horas de incubação da cultura. Este período foi maior que o encontrado por Andrade et al., (2011) para culturas submersas de *Bacillus* sp. SMIA-2 contendo fontes puras de pectina, que foi de 36 horas. Segundo Ferraz et al. (2010), o fato das pectinases serem produzidas tardiamente se deve ao fato da produção e liberação das enzimas ao meio estar sujeita a mecanismos de regulação e síntese, visto que o processo de indução dessas enzimas está sujeito a modificações na estrutura do substrato que ocorrem durante o crescimento dos micro-organismos. Souza et al. (2010) estudaram a produção de

poligalacturonase produzida por fermentação semissólida utilizando resíduo de maracujá como substrato e encontraram que a máxima atividade da poligalacturonase ($20,9 \text{ U.g}^{-1}$) foi obtida após 66 horas de fermentação.

Bacillus sp SMIA-2 foi capaz de produzir níveis consideráveis de xilanases ($0,76 \text{ U/mL}$) nos filtrados de culturas submersas contendo a farinha da casca do maracujá (Figura 4). A atividade das enzimas aumentou com o período de incubação da cultura atingindo o valor máximo após 72 horas e então decresceu.

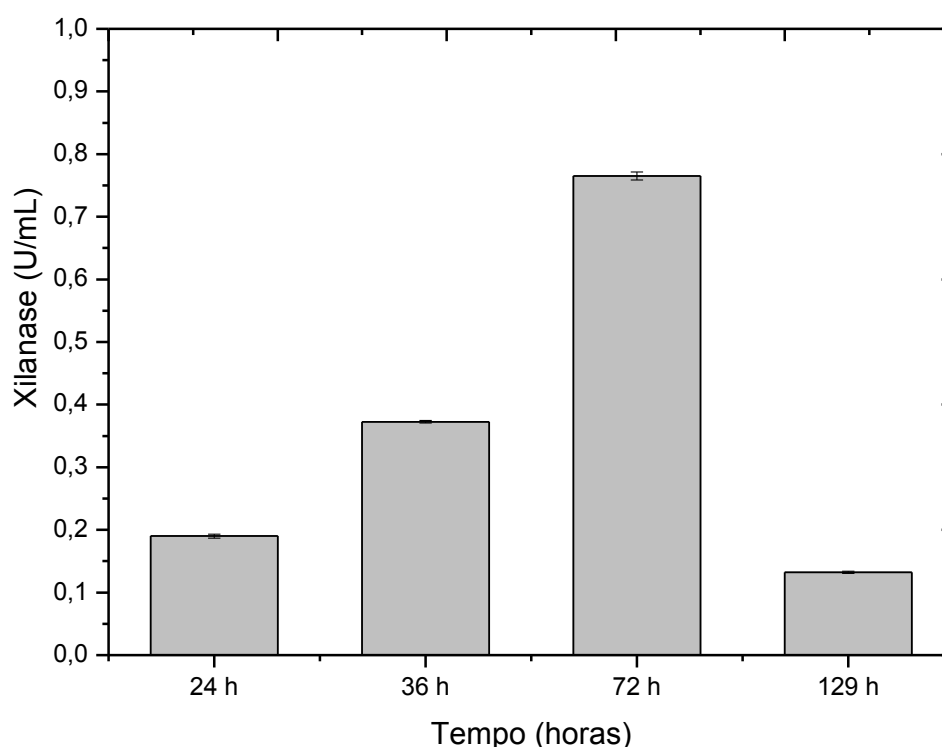


Figura 4: Atividade de xilanases de *Bacillus* sp. SMIA-2 em culturas líquidas contendo farinha da casca de maracujá (0,5%, m/v) e água de maceração de milho (0,5%, m/v) incubadas a 50°C.

Resultados similares foram encontrados por Ladeira (2013) em que *Bacillus* sp. SMIA-2 produziu os maiores níveis de xilanases ($0,507 \text{ U.mg ptn}^{-1}$) em culturas submersas contendo bagaço de cana após 72 horas de incubação. Além disso, Cordeiro et al. (2002), também relataram maiores níveis de atividade de xilanases quando este micro-organismo foi cultivado em fontes puras de xilana.

A maior parte dos micro-organismos que produzem celulasas também

produzem xilanases e ambas as enzimas são frequentemente secretadas sob as mesmas condições da cultura. Almeida (2013) estudando a produção de celulasas e xilanases em *Aspergillus niger* encontrou que a maior quantidade destas enzimas foi obtida na fase estacionária de crescimento. Entretanto, nessa faixa de crescimento houve variação da atividade das enzimas em relação ao tempo de incubação e que parâmetros como agitação da cultura influenciaram a atividade enzimática.

Vários estudos têm relatado a produção de xilanases alcalinas e termoestáveis por micro-organismos termofílicos (Guimaraes et al., 2013; Ladeira, 2013; Dhillon et al., 2008; Gírio et al., 2010; Soundari e Sashi, 2009; Collins et al., 2005; Cordeiro et al., 2002), uma vez que xilanases ativas em temperaturas mais altas são de grande interesse na indústria. A disponibilidade de xilanases isoladas da natureza com as características de termoestabilidade e pH desejados é limitado, mas os benefícios potenciais da utilização dessas enzimas para processos biotecnológicos encorajaram estudos sobre a produção destas enzimas utilizando micro-organismos termofílicos.

Como para as enzimas celulasas e xilanases, a máxima atividade da α -amilase foi observada após 72 horas de incubação das culturas de *Bacillus* sp. SMIA-2 contendo farinha da casca de maracujá, como mostrado na Figura 5.

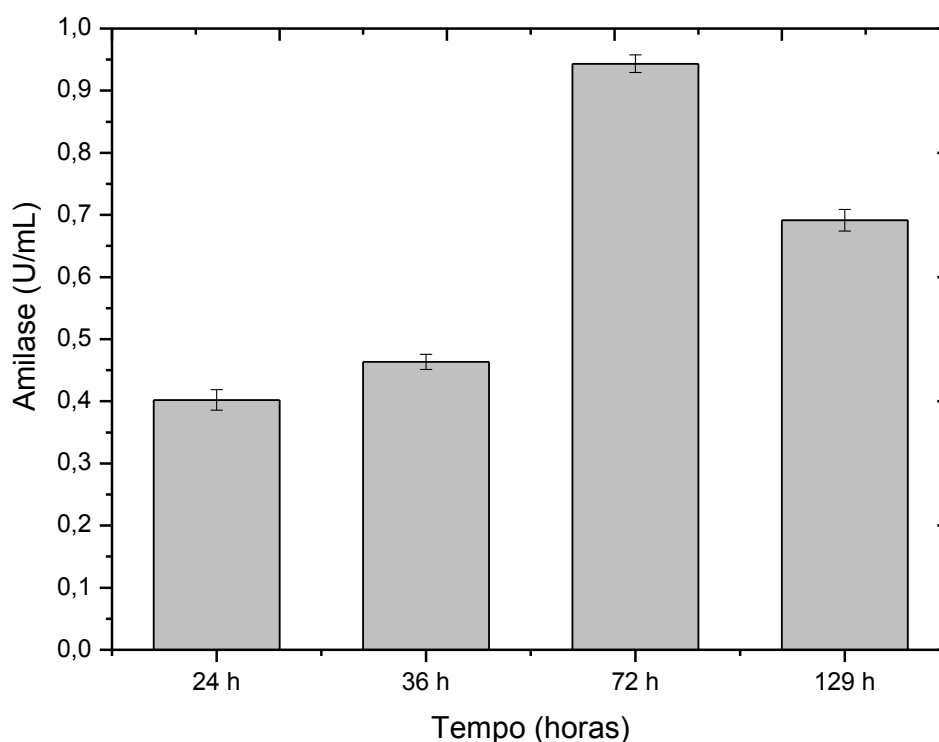


Figura 5: Atividade de α -amilases de *Bacillus* sp. SMIA-2 em culturas líquidas contendo farinha da casca de maracujá (0,5%, m/v) e água de maceração de milho (0,5%, m/v) incubadas a 50°C.

Resultados são similares aos reportados por Carvalho et al. (2008a) para *Bacillus* sp. SMIA-2 cultivado em amido, em que a síntese da enzima foi aumentada quando a velocidade de crescimento diminuiu e atingiu a fase estacionária. Entretanto, o período de 72 horas foi maior que o encontrado por esses autores, que foi de 32 horas. As diferenças de síntese das enzimas nas diversas fases de crescimento podem ser atribuídas a vários fatores incluindo a composição do meio de cultura. A utilização da farinha da casca de maracujá como substrato para a indução da síntese de α -amilases por *Bacillus* sp. SMIA-2 pode ter requerido diferentes níveis de agitação, que aqueles utilizados para os meios sintéticos para facilitar uma melhor e mais uniforme transferência de massa, devido à natureza fibrosa e particulada deste resíduo.

Considerando o alto teor de proteínas presentes na farinha da casca de maracujá em torno de 3,94% (Cazarin et al. 2014) utilizadas como substrato para o crescimento de *Bacillus* sp. SMIA-2, o perfil da atividade de proteases em função do período de incubação das culturas foi determinado. Maiores níveis de atividade destas enzimas foram obtidos com 36 horas de incubação da cultura e permaneceram sem alteração até 72 horas quando então começaram a decrescer (Figura 6).

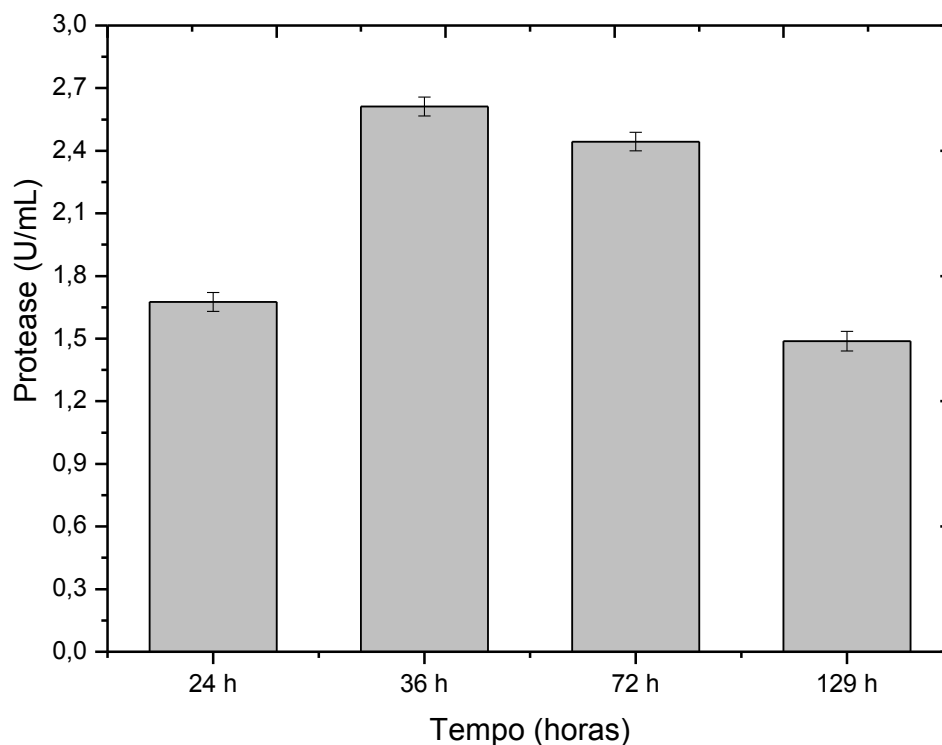


Figura 6: Atividade de proteases de *Bacillus sp. SMIA-2* em culturas líquidas contendo farinha da casca de maracujá (0,5%, p/v) e água de maceração de milho (0,5%, p/v) incubadas a 50°C.

Barbosa et al. (2014), avaliando a produção de proteases por *Bacillus sp. SMIA-2* em meio de cultura constituído de 0,25% (m/v) farinha da casca de maracujá e 0,5% (m/v) soro de leite encontraram que a atividade máxima destas enzimas foi obtida após 72 horas de incubação da cultura. Uma vez que as outras enzimas (celulases, poligalacturonases, xilanases e amilases) produzidas por *Bacillus sp. SMIA-2* são proteínas, as mesmas podem ser inibidas pelas proteases (Rajmohan et al., 2002). Entretanto, como mostrado na Figura 7, as outras enzimas foram resistentes à digestão pelas proteases, principalmente as avicelases.

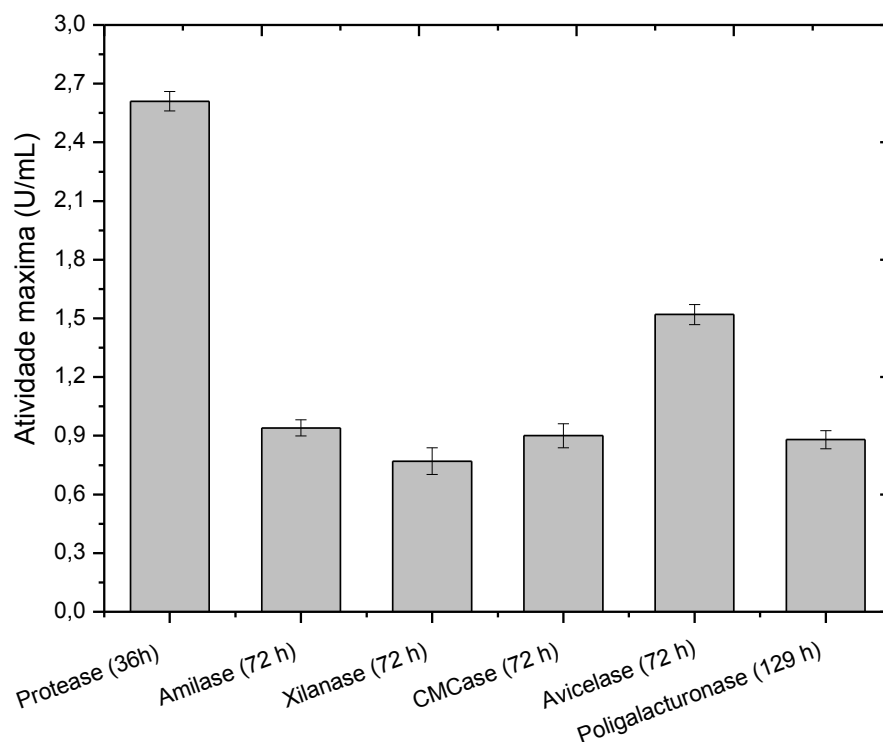


Figura 7: Atividade máxima das enzimas secretadas por *Bacillus* sp. SMIA-2 em culturas líquidas contendo farinha da casca de maracujá (0,5%, p/v) e água de maceração de milho (0,5%, p/v) incubadas a 50°C.

Convencionalmente, múltiplas enzimas são produzidas por culturas mistas compostas por diferentes micro-organismos ou pela mistura de várias enzimas diretamente por meio de micro-organismos geneticamente modificados dotados com múltiplas funções (Zhang et al., 2004; Zaghloul et al., 2000). Mas, a produção concomitante de várias enzimas em um único processo fermentativo utilizando apenas um micro-organismo é de grande importância para aumentar a eficiência e a economia do processo. Portanto, a utilização da farinha da casca do maracujá como substrato para o crescimento de *Bacillus* sp. SMIA-2 e produção de enzimas termoestáveis representa uma importante fonte alternativa para o aproveitamento das cascas do maracujá.

O Brasil é o principal produtor mundial de maracujá e sua utilização industrial ou doméstica, gera, inevitavelmente, grandes quantidades de resíduos. A casca constitui cerca de metade da massa do fruto, de 50 a 55 g por 100 g. Este descarte gera um grande impacto ambiental e a procura por soluções torna-se um alvo importante para a biotecnologia (Seixas et al., 2014).

As bactérias do gênero *Bacillus* têm várias características que as tornam micro-organismos ideais para aplicações industriais, tais como capacidade de fermentação e altos níveis de secreção de proteínas e em particular uma ampla gama de enzimas para a degradação dos polissacarídeos da parede celular da planta, as quais são de grande importância para a indústria de alimentos (Bon et al., 2008).

Estes resultados mostram a importância do sinergismo das enzimas secretadas por *Bacillus* sp. SMIA-2 para a degradação da farinha da casca de maracujá. As mais altas atividades obtidas para proteases seguidas das avicelases sugerem que a composição do meio e as condições da cultura favoreceram a maior secreção destas enzimas pelo micro-organismo. Deste modo, foi importante estudar a influência da concentração do substrato (farinha da casca de maracujá "FCM") e do pH inicial do meio de cultivo na produção do conjunto enzimático a partir do planejamento fatorial 2^2 pelo Delineamento Composto Central (DCC).

5.2. Otimização da produção do conjunto enzimático (proteases, α -amilases, poligalacturonases, xilanases e celulases) de *Bacillus* sp. SMIA-2 utilizando planejamento fatorial 2^2 pelo Delineamento Composto Central (DCC).

Os valores de crescimento celular (DO 600 nm), pH final e na atividade das enzimas proteases (U/mL), α -amilases (U/mL), poligalacturonases (U/mL), xilanases (U/mL) e avicelase (U/mL) encontram-se na Tabela 8. Os efeitos exercidos pela concentração de farinha da casca do maracujá (FCM) e pH inicial do meio de cultura foram determinados pela análise estatística em nível de 95% de significância e têm seus dados relacionados ao crescimento microbiano, ao pH final e à produção de enzimas hidrolíticas apresentados na Tabela 9 e ilustrados com os diagramas de Pareto (Figura 8).

Tabela 8: Crescimento microbiano, pH final e produção de enzimas hidrolíticas do *Bacillus* sp. SMIA-2 em cada condição de fermentação após 72 horas a 50°C e 150 rpm.

Ensaio	Condições de Fermentação		DO _{600nm} (Y ₁)	pH _{final} (Y ₂)	Protease (Y ₃)	Amilase (Y ₄)	Poligalacturonase (Y ₅)	Xilanase (Y ₆)	Avicelase (Y ₇)
	g.L ⁻¹ FCM (X ₁)	pH _{inicial} (X ₂)							
	1	-1							
2	1	-1	1,20	9,40	8,54	0,05	2,16	1,50	2,77
3	-1	1	1,02	9,27	12,33	0,21	1,90	1,39	3,30
4	1	1	1,20	9,41	7,16	0,09	1,75	2,10	3,09
5	0	0	1,08	9,25	11,94	0,15	1,95	1,69	2,99
6	0	0	1,07	9,26	11,86	0,13	1,99	1,68	2,99
7	0	0	1,07	9,25	11,81	0,14	2,04	1,68	2,98

Tabela 9: Estimativa dos efeitos sobre o parâmetro de crescimento microbiano, pH final e produção de enzimas hidrolíticas do *Bacillus* sp. SMIA-2.

	DO _{600nm}		pH final		Protease		Amilase		Poligalacturonase		Xilanase		Avicelase	
	Efeito	<i>p</i>	Efeito	<i>p</i>	Efeito	<i>p</i>	Efeito	<i>p</i>	Efeito	<i>p</i>	Efeito	<i>p</i>	Efeito	<i>p</i>
Média	1,0911	0,000003	9,2914	0,000000	11,2789	0,000005	0,1462	0,000084	2,0523	0,000067	1,5641	0,000005	3,0112	0,000001
X₁	0,1867	0,000823	0,1783	0,000814	-5,9740	0,000136	-0,1572	0,001233	-0,2843	0,024158	0,6535	0,000063	-0,1915	0,001530
X₂	0,0130	0,136031	0,0417	0,014607	-2,1860	0,001018	0,0000	1,000000	-0,5385	0,006913	0,5469	0,000090	0,3307	0,000514
X₁*X₂	-0,0087	0,247141	-0,0317	0,024893	0,8040	0,007453	0,0443	0,074817	0,1282	0,104361	0,0575	0,008093	-0,0142	0,197947

Analisando a Tabela 9 verificou-se que dentre as variáveis independentes estudadas, a concentração de farinha da casca do maracujá foi a que exerceu efeito significativo em todas as variáveis respostas observadas, enquanto que o pH do meio exerceu efeito significativo no pH final e na atividade enzimática das enzimas proteases, poligalacutoronases, xilanases e avicelases, com um limite de confiabilidade de 95%.

A concentração de farinha da casca do maracujá exerceu efeito significativo positivo no crescimento celular, pH final do meio e produção de enzimas xilanases. Desta forma, pode-se afirmar, com 95% de confiança, que quanto maior é a concentração da farinha da casca do maracujá no meio de cultura, maior será o valor dessas variáveis. Em relação à atividade enzimática das proteases, α -amilases, poligalacutoronases e avicelases o efeito foi negativo, o que permite afirmar, com 95% de confiança, que quanto maior é a concentração da farinha da casca do maracujá no meio de cultura, menor será a produção dessas enzimas (Tabela 9).

Em relação ao pH inicial do meio de cultura, observa-se efeito negativo sobre a produção das enzimas proteases e poligalacutoronases, o que permite afirmar, com 95% de confiança, que quanto maior é o pH inicial do meio, menor será a produção dessas enzimas. Entretanto, esta variável apresentou efeito positivo na produção das enzimas xilanases e avicelases, ou seja, quanto maior for o pH inicial do meio de cultura, maior será a produção destas enzimas em nível de 95% de confiança (Tabela 9).

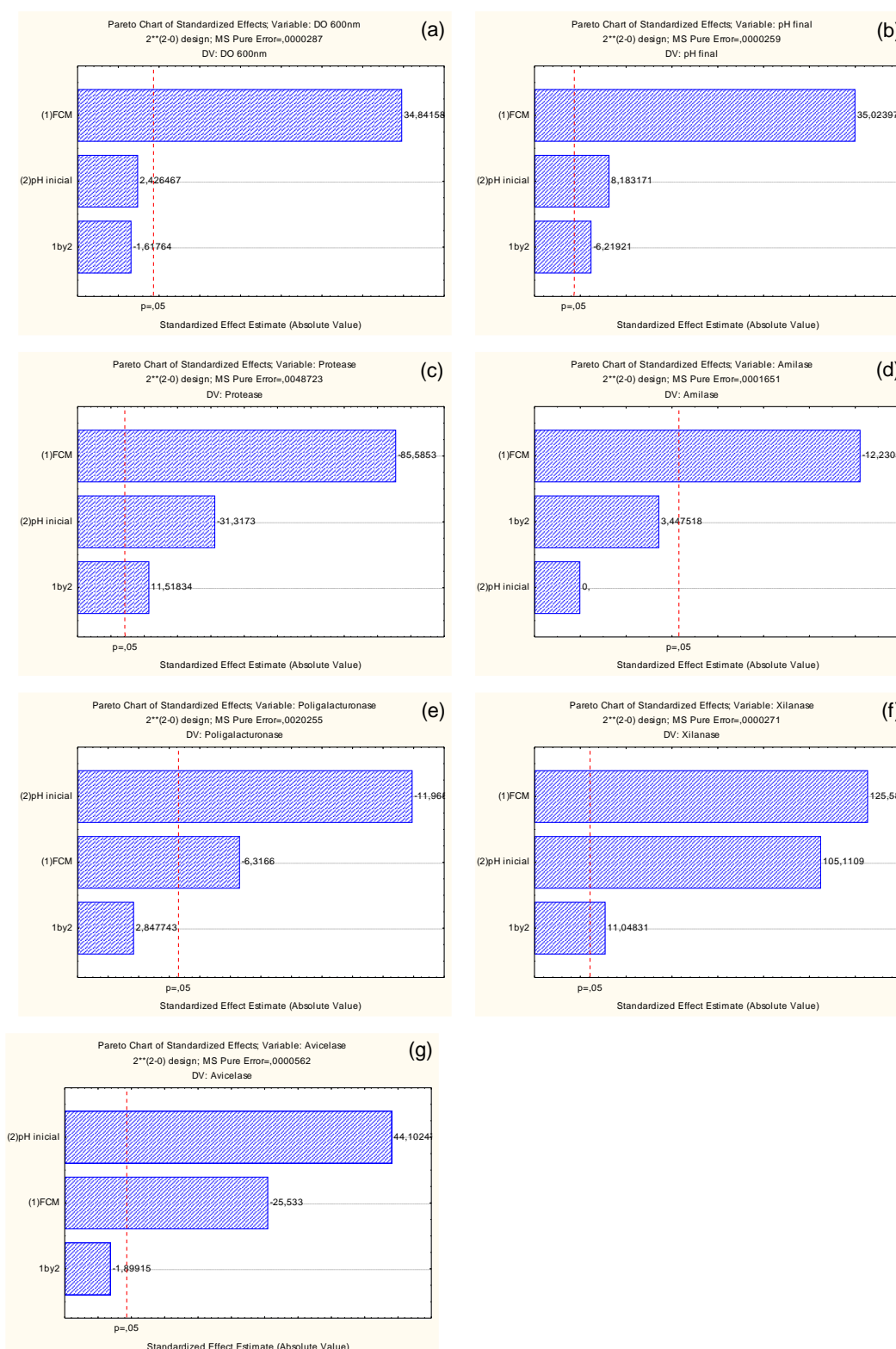


Figura 8: Diagramas de Pareto para a resposta do crescimento celular (a), pH final (b) e produção das enzimas proteases (c), α -amilases (d), poligalacturonases (e), xilanases (f) e avicelases (g).

A Tabela 10 apresenta os coeficientes de regressão que tiveram efeito significativo em nível de 5% de significância sobre o crescimento microbiano, o pH final e a produção de enzimas hidrolíticas do *Bacillus* sp. SMIA-2. Os demais foram eliminados para dar sequência à avaliação estatística.

Tabela 10: Coeficiente de regressão para crescimento microbiano, pH final e produção de enzimas hidrolíticas do *Bacillus* sp. SMIA-2.

		Coef. de regressão	Erro puro	p	R^2
DO (600nm)	Média	0,94476	0,005727	0,000040	0,9508
	FCM	0,37333	0,010715	0,000823	
pH final	Média	8,32595	0,085565	0,000106	0,8269
	FCM	1,306667	0,153092	0,013451	
	pH inicial	0,105000	0,011386	0,011554	
	FCM*pH inicial	-0,126667	0,020367	0,024893	
Protease	Média	45,7079	1,172986	0,000658	0,9572
	FCM	-36,0680	2,098700	0,003369	
	pH inicial	-3,7940	0,156081	0,001688	
	FCM*pH inicial	3,2160	0,279207	0,007453	
α -amilase	Média	0,303401	0,013738	0,002044	0,9090
	FCM	-0,314346	0,025702	0,006619	
Poligalacutoronase	Média	6,375354	0,340954	0,002848	0,9110
	FCM	-0,568565	0,090011	0,024158	
	pH inicial	-0,538502	0,045006	0,006913	
Xilanase	Média	-2,32914	0,087442	0,001406	0,9013
	pH inicial	0,43196	0,011635	0,000725	
	FCM*pH inicial	0,22996	0,020814	0,008093	
Avicelase	Média	0,7222950	0,056806	0,006129	0,9788
	FCM	-0,382911	0,014997	0,001530	
	pH inicial	0,330696	0,007498	0,000514	

$$DO_{600nm} = 0,94 + 0,37.X_1 \quad (\text{Eq.1})$$

$$pH \text{ final} = 8,32 + 1,31.X_1 + 0,11.X_2 - 0,13.X_1.X_2 \quad (\text{Eq.2})$$

$$\text{Protease} = 45,71 - 36,07.X_1 - 3,79.X_2 + 3,22.X_1.X_2 \quad (\text{Eq.3})$$

$$\alpha\text{-amilase} = 0,30 - 0,31.X_1 \quad (\text{Eq.4})$$

$$\text{Poligalacturonase} = 6,38 - 0,57.X_1 - 0,53.X_2 \quad (\text{Eq.5})$$

$$\text{Xilanase} = -2,33 + 0,43.X_2 + 0,23.X_1.X_2 \quad (\text{Eq.6})$$

$$\text{Avicelase} = 0,72 - 0,38.X_1 + 0,33.X_2 \quad (\text{Eq.7})$$

Os valores utilizados para os cálculos estatísticos foram os valores codificados das variáveis independentes.

Os coeficientes de regressão significativos têm um intervalo de confiança de 95% baseado no erro puro. A partir de então foram obtidos os modelos estatísticos ajustados para os valores codificados das variáveis independentes do planejamento em relação às respostas estudadas.

O crescimento celular foi transcrito pela Equação 1 com um R^2 indicando que 95,08% da variação da resposta pode ser explicado pelo modelo, pH final foi transcrito pela Equação 2 com R^2 explicando 82,69% da variação por meio do modelo, a protease foi transcrita pela Equação 3 com um R^2 indicando que 95,72% da variação da resposta pode ser explicada pelo modelo, a amilase foi transcrita pela Equação 4 com um R^2 indicando que 90,90% da variação da resposta pode ser explicada pelo modelo, a poligalacturonase foi transcrita pela Equação 5 com um R^2 indicando que 91,10% da variação da resposta pode ser explicada pelo modelo, a xilanase foi transcrita pela Equação 6 com um R^2 indicando que 90,13% da variação da resposta pode ser explicada pelo modelo e a Avicelase foi transcrita pela Equação 7 com um R^2 indicando que 97,88% da variação da resposta pode ser explicada pelo modelo.

A significância da regressão e da falta de ajuste foi verificada pela análise de variância (ANOVA) com intervalo de confiança de 95% para validar o ajuste dos dados experimentais ao modelo proposto pelas equações obtidas.

Na Tabela 11 estão apresentados os resultados da análise da variância (ANOVA) em nível de confiança de 95% ($p < 0,05$) para as variáveis respostas, revelando que os modelos ajustados foram significativos de acordo com a análise do teste F , porque o valor de probabilidade p (0,0001) foi muito menor do que 0,05. Quando o valor de F calculado for maior que o F tabelado para o nível de confiança adotado, há evidência estatística suficiente para supor a existência de uma relação entre as variáveis (Barros Neto et al., 2001). No entanto, nota-se que no primeiro caso a falta de ajuste também significativa deste modelo sugere a necessidade de se pesquisar um modelo matemático que, necessariamente, seja mais apropriado para prever a produção do complexo enzimático como uma função da concentração de farinha da casca de maracujá (FCM) e variação no pH inicial do meio de cultivo.

Tabela 11: Análise de variância (ANOVA) para o crescimento microbiano, pH final e produção de enzimas hidrolíticas do *Bacillus* sp. SMIA-2

Fonte de variação	SQ	GL	QM	Fcal	Ftab
DO (600nm)					
Reg. (FCM)	0,034844	1	0,0348844	1213,935	0,000823
Falta de ajuste	0,001747	3	0,000582	20,290	0,047335
Erro Puro	0,000057	2	0,000029		
Total	0,036649	6			
pH final					
Reg. (FCM)	0,031803	1	0,031803	1226,679	0,000814
Reg. (pH inicial)	0,001736	1	0,001736	66,964	0,014607
Reg. (FCM x pH inicial)	0,001003	1	0,001003	38,679	0,024893
Falta de ajuste	0,007181	1	0,007181	276,985	0,003591
Erro Puro	0,000052	2	0,000026		
Total	0,041775	6			
Protease					
Reg. (FCM)	35,68868	1	35,68868	7324,841	0,000136
Reg. (pH inicial)	4,77860	1	4,77860	980,772	0,001018
Reg. (FCM x pH inicial)	0,64642	1	0,64642	132,672	0,007453
Falta de ajuste	1,83071	1	1,83071	375,740	0,002651
Erro Puro	0,00974	2	0,00487		
Total	42,95414	6			
α-amilase					
Reg. (FCM)	0,024703	1	0,024703	149,5847	0,006619
Falta de ajuste	0,002144	3	0,000715	4,3273	0,193402
Erro Puro	0,000330	2	0,000165		
Total	0,027178	6			
Poligalacutoronase					
Reg. (FCM)	0,080817	1	0,080817	39,8994	0,024158
Reg. (pH inicial)	0,289985	1	0,289985	143,1662	0,006913
Falta de ajuste	0,032193	2	0,017310		
Erro Puro	0,004051	2	0,002033		
Total	0,407046	6			
Xilanase					
Reg. (FCM)	0,427037	1	0,427037	157771,79	0,000063
Reg. (pH inicial)	0,299144	1	0,299144	11048,31	0,000090
Reg. (FCM x pH inicial)	0,003305	1	0,003305	122,07	0,008093
Falta de ajuste	0,079838	1	0,079838	2948,64	0,000339
Erro Puro	0,000054	2	0,000027		
Total	0,809379	6			
Avicelase					
Reg. (FCM)	0,036655	1	0,036655	651,934	0,001530
Reg. (pH inicial)	0,109360	1	0,109360	1945,028	0,000514
Falta de ajuste	0,003052	2	0,001526	27,143	0,035533
Erro Puro	0,000112	2	0,000056		
Total	0,149180	6			

De acordo com a Tabela 11, referente ao crescimento celular, ao pH final e à produção de enzimas extracelulares, o valor de F calculado da regressão foi maior que o F tabelado em todas as variáveis independentes. Em relação à falta de ajuste, $F_{\text{calc.}}$ foi maior que o $F_{\text{tab.}}$ para crescimento celular, pH final, proteases, amilases, xilanases e avicelases, entretanto, para as poligalacturonases o $F_{\text{calc.}}$ foi menor que o $F_{\text{tab.}}$, havendo diferença significativa para regressão e não havendo diferença significativa para a falta de ajuste somente para as poligalacturonases, ou seja, o modelo obtido é ajustado e válido e as variáveis respostas estão apresentadas nas Eq. 1 a Eq. 7.

Confirmou-se a significância estatística de todas as variáveis independentes e, desta forma, os resultados sugeriram a conveniência de se trabalhar com as mais baixas concentrações de farinha da casca de maracujá (FCM) para produção de proteases, amilases, poligalacturonases e avicelases e altas concentrações de FCM para produção de xilanases. Em relação à variação do pH inicial, torna-se viável trabalhar com valores entre 7,0-7,5 para produção de proteases e poligalacturonases e valores de pH inicial acima de 7,5 favorecem a produção de xilanases e avicelases. Sendo que a FCM foi a variável que apresentou um efeito mais acentuado sobre a produção do complexo enzimático.

5.3. Purificação parcial das enzimas e avaliação do efeito da temperatura e do pH em sua atividade

5.3.1. Precipitação com Sulfato de Amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Durante o processo fermentativo para obtenção de uma enzima são gerados, além do composto desejado, coprodutos que impedem, muitas vezes, a utilização do caldo bruto da fermentação nos procedimentos industriais (Malpiedi et al., 2009). As enzimas comerciais apresentam-se desde preparações enzimáticas brutas até enzimas altamente purificadas (Bon et al., 2008). Neste trabalho as enzimas secretadas por *Bacillus* sp. SMIA-2 foram parcialmente purificadas. O processo consistiu de 2 etapas: precipitação do extrato bruto (sobrenadante da cultura livre de células) com sulfato de amônio seguida da diálise. Os resultados obtidos para purificação parcial estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12: Purificação parcial das enzimas extracelulares produzidas por *Bacillus* sp. SMIA-2

Enzimas	Ext. Bruto (U/mL)	Proteína Ext. Bruto (mg/mL)	Proteína Ext. Dialisado (mg/mL)	Ativ. específica Ext. Dialisado (U/mg proteína)
Protease	10,89	0,26	0,19	67,79
Amilase	1,53	0,26	0,19	10,85
Xilanase	1,52	0,26	0,19	7,68
CMCase	0,81	0,26	0,19	3,32
Avicelase	2,95	0,26	0,19	18,14
Poligalacturonase	2,68	0,26	0,19	12,26

Os níveis de proteína totais obtidos de culturas após 72 horas de incubação foram dosados e foi observada uma redução de 76,24% no extrato dialisado em relação ao extrato bruto. As proteínas presentes no extrato bruto podem ter sido originadas do próprio substrato utilizado no meio de cultura (proteínas da farinha da casca do maracujá) ou das próprias células da bactéria após a sua lise e ainda podem constituir diferentes enzimas secretadas para digerir o substrato.

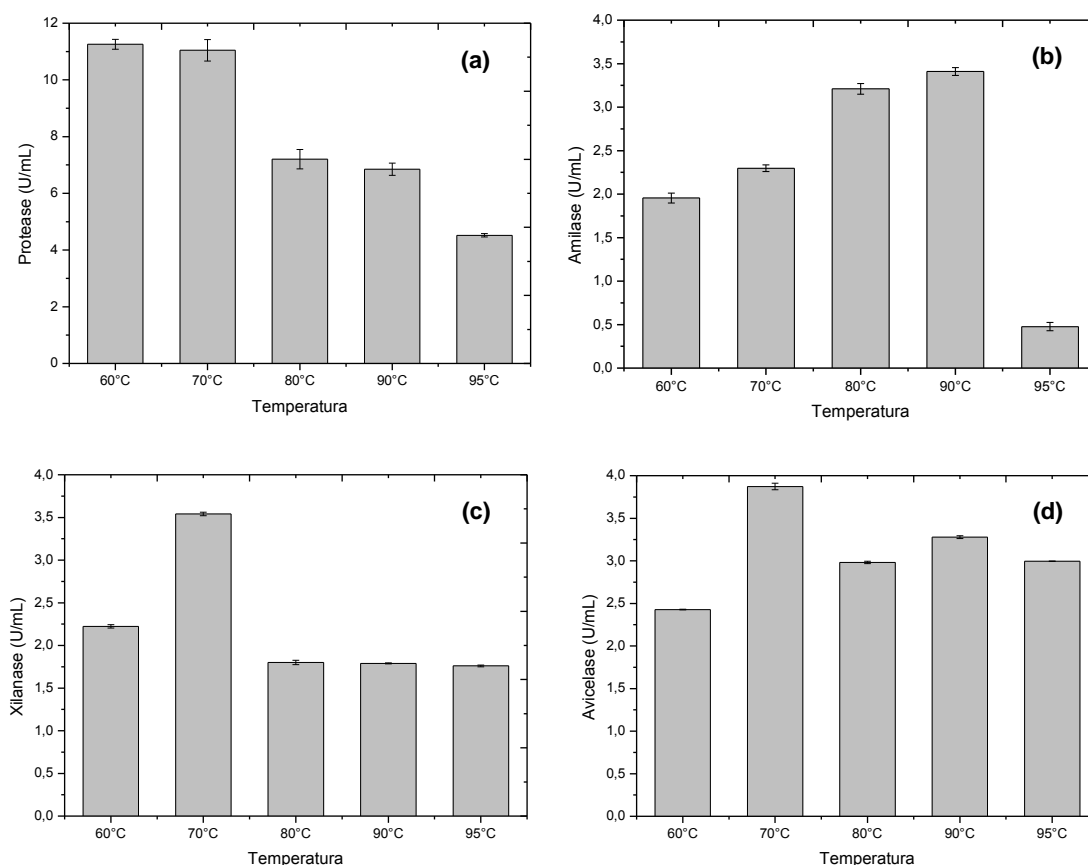
Os procedimentos utilizados para a remoção total destas proteínas nos extratos brutos da cultura são de alto custo e por isso, a maior parte das enzimas industriais é utilizada na presença de impurezas originadas dos filtrados da cultura. Desta maneira, as enzimas secretadas por *Bacillus* sp. SMIA-2 não foram purificadas além da precipitação com sulfato de amônio seguido da diálise.

As atividades das enzimas no extrato bruto após a precipitação com sulfato de amônio seguido da diálise obtiveram um aumento considerável quando comparadas à atividade dessas enzimas no extrato bruto. Este aumento era esperado, uma vez que os processos têm a finalidade de remover contaminantes não proteicos e a remoção de proteínas que não sejam de interesse de forma a se obter o máximo de atividade específica e da atividade inicial (Fedatto, 2004). Portanto, como primeiro passo da etapa de purificação, a precipitação com sulfato de amônio foi eficiente além de rápida. Para fins comerciais a enzima não necessita de uma pureza absoluta, por isso essas etapas podem ser empregadas com sucesso (Gentil, 2014).

A maior atividade das enzimas na fração dialisada de filtrados da cultura de *Bacillus* sp. SMIA-2 foi observada para a protease (Tabela 12). Portanto, a bactéria *Bacillus* sp. SMIA-2 em presença dos substratos resíduos da casca de maracujá mostrou-se capaz de produzir enzimas amilase, pectinase, celulase e protease, com destaque para esta última que apresentou uma produção superior aos resultados encontrados na literatura.

5.3.2. Efeito da temperatura na atividade e estabilidade das enzimas

A temperatura para atividade ótima da maioria das enzimas estudadas foi 70°C. A α -amilase apresentou a maior temperatura que foi de 80-90°C e a protease a menor que foi 60-70°C (Figura 9).



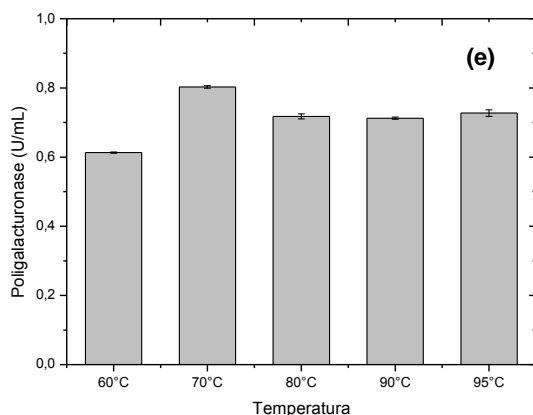


Figura 9: Efeito da temperatura na atividade das enzimas secretadas por *Bacillus* sp. SMIA-2 em culturas submersas contendo farinha da casca de maracujá suplementada com água de maceração de milho por 72 horas a 50°C.

Em estudos prévios realizados com estas enzimas produzidas por *Bacillus* sp. SMIA-2 foi encontrado que a temperatura para a atividade ótima da avicelase e xilanase quando este microrganismo foi cultivado em culturas submersas contendo fontes puras (avicel) e complexas (bagaço de cana) de celulose foi de 70°C (Ladeira et al., 2015; Oliveira et al., 2014). Segundo Andrade et al. (2011), a poligalacturonase produzida por *Bacillus* sp. SMIA-2 em culturas submersas contendo pectina cítrica também apresentou temperatura para atividade ótima de 70°C. Em relação à protease e à α -amilase a temperatura ótima encontrada para atividade destas enzimas foi similar àquelas relatadas por Barbosa (2011), 70°C para protease e 90°C para α -amilase, que utilizaram diferentes condições de cultivo para este micro-organismo.

A termoestabilidade das enzimas está apresentada na figura 10. A estabilidade térmica é um aspecto muito importante nos processos enzimáticos, e a utilização de enzimas em processos industriais, muitas vezes fica impossibilitada por problemas de inativação térmica.

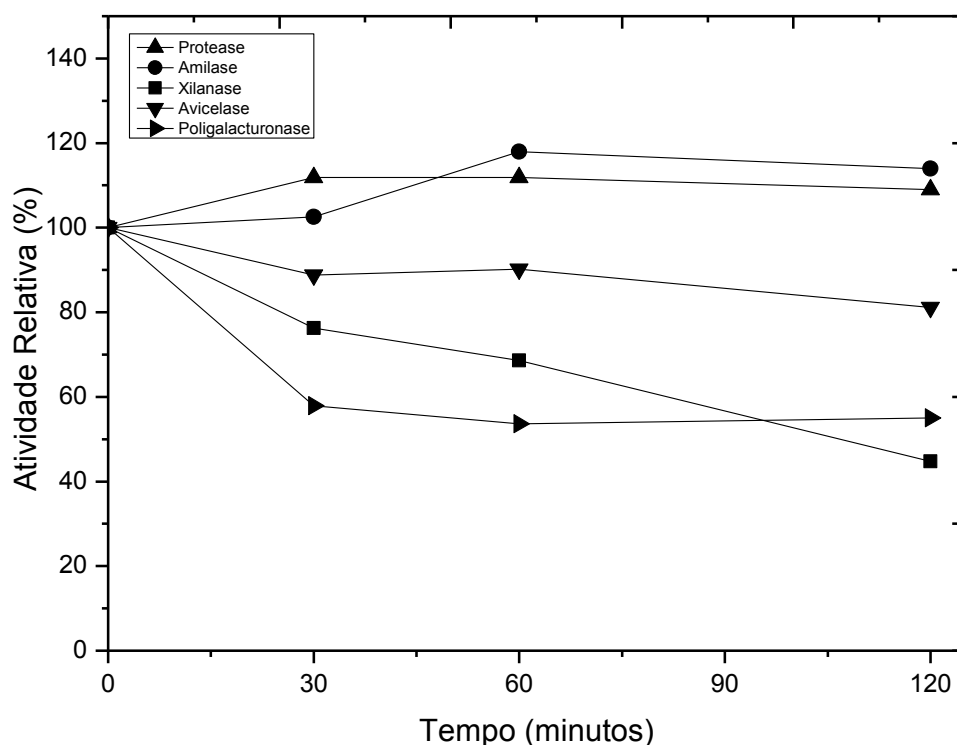


Figura 10: Estabilidade à temperatura de 50°C das enzimas produzidas por *Bacillus* sp. SMIA-2 em culturas submersas contendo farinha da casca de maracujá suplementada com água de maceração de milho por 72 horas a 50°C.

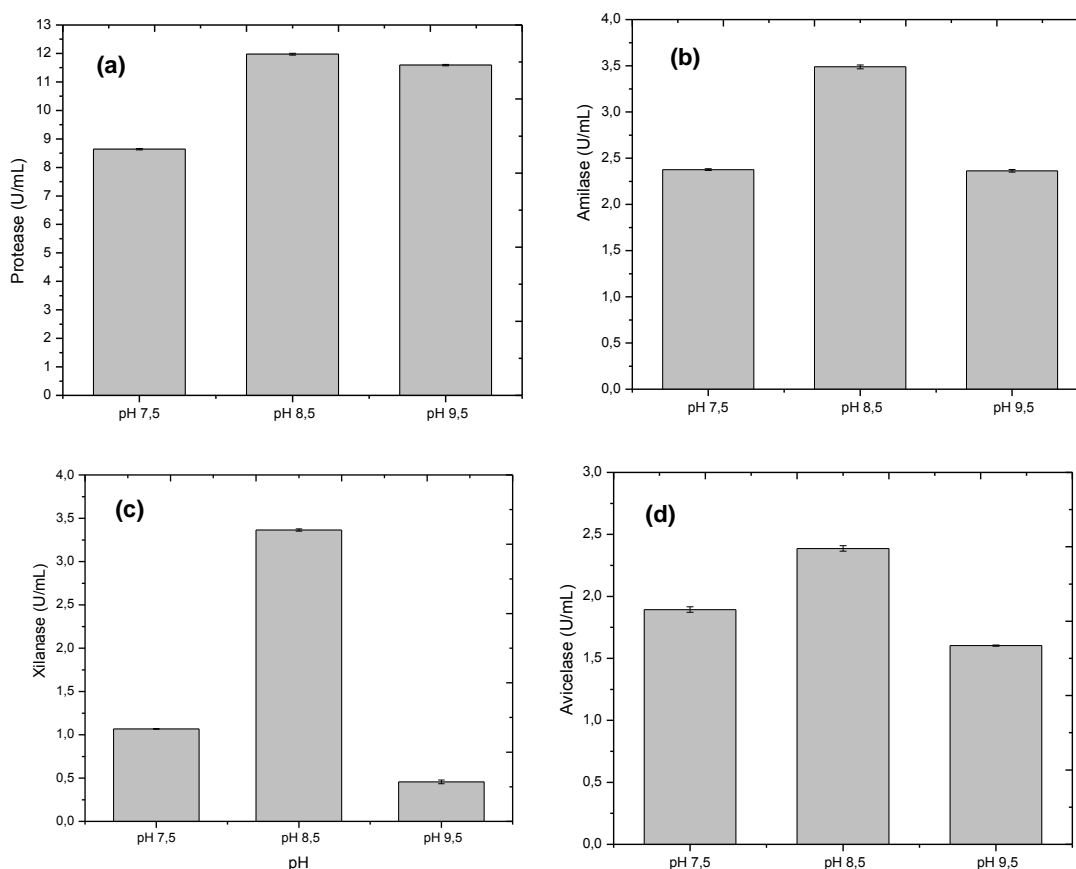
Quando o objetivo é a aplicação industrial das enzimas, é também importante um conhecimento maior a respeito dos dados de termoestabilidade. Para melhorar a termoestabilidade da proteína, é importante encontrar os pontos fracos na estrutura proteica, que permitem revelar os sítios susceptíveis à elevação de temperatura. Esta informação é então usada para planejar mutações sítio-dirigidas em proteínas mesófilas (Santos, 2008).

Os ensaios de termoestabilidade realizados comparando as enzimas produzidas por *Bacillus* sp. SMIA-2 utilizando a farinha da casca de maracujá com as mesmas enzimas produzidas pela mesma bactéria em diferentes substratos e por outros micro-organismos revelaram que as enzimas apresentaram boa estabilidade a 50°C. As proteases e as avicelases mantiveram suas atividades a 50°C por até 120 minutos e as xilanases, amilases e poligalacturonases perderam em torno de 30-40% de suas atividades.

5.3.3. Efeito do pH na atividade e estabilidade das enzimas

As melhores atividades das enzimas foram encontradas em pHs alcalinos (Figura 11). Com exceção da xilanase, as enzimas também apresentaram boa atividade a pH 9,5. Além disso, foram estáveis na faixa de pH compreendida entre 7,5-8,5, sugerindo que as enzimas têm potencial para aplicação em processos industriais, que requerem essa condição.

O pH ótimo (Figura 11) e a estabilidade ao pH (Figura 12) apresentados pelas proteases, amilases, poligalacturonases, avicelases e xilanases são próximos aos encontrados por Ladeira et al. (2015); Barbosa et al. (2014); Oliveira et al. (2014); Ladeira et al. (2012); Ladeira et al. (2010); Andrade et al. (2011); Cordeiro e Martins (2009); Carvalho et al. (2008b); Silva et al. (2007); Nascimento e Martins (2004), que estudaram a influência deste parâmetro na atividade das enzimas. Além disso, são similares aos encontrados na literatura para espécies de *Bacillus*.



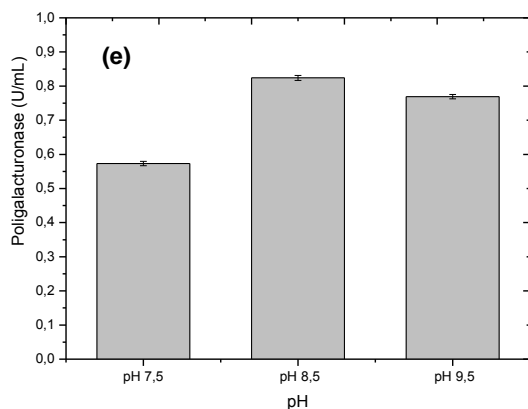


Figura 11: Efeito do pH na atividade das enzimas secretadas por *Bacillus* sp. SMIA-2 em culturas submersas contendo farinha da casca de maracujá suplementada com água de maceração de milho por 72 horas a 50°C.

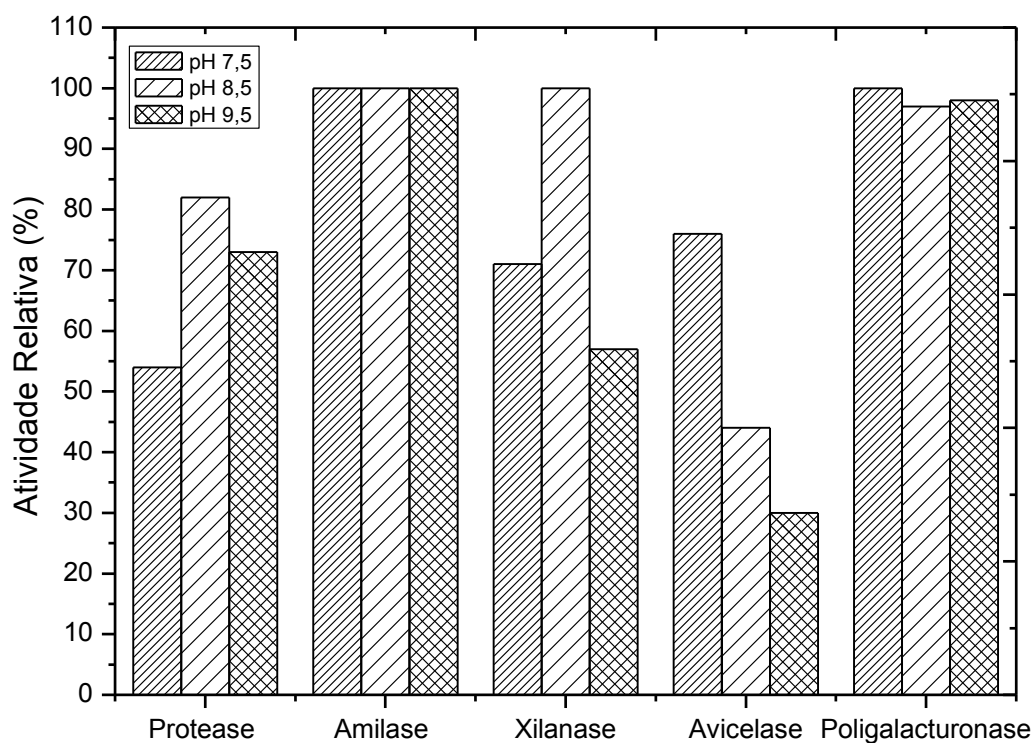


Figura 12: Estabilidade das enzimas de *Bacillus* sp. SMIA-2 a diferentes valores de pH por 2 horas.

5.3.4. Aplicação das enzimas na remoção de sujidades de tecidos

Considerando que as enzimas produzidas simultaneamente por *Bacillus* sp SMIA-2 apresentaram atividade e estabilidade a valores de pH alcalino e a temperaturas relativamente elevadas (50°C) testes foram realizados para avaliar a eficácia das enzimas na remoção de sujidades de tecidos padrão sujos com chocolate (EMPA 112), sangue (EMPA 111) e ovo (STC CFT CS 09), todos da TEXCONTROL®.

Os resultados apresentados na Tabela 13 mostraram que após a lavagem das peças dos tecidos sujos com gema de ovo com a solução enzimática e também com a água apresentaram valores similares para o parâmetro “L” e o croma.

Tabela 13: Parâmetro “L” e “Croma” de tecidos padrão sujos com gema de ovo, sangue, e chocolate submetidos à lavagem com água de torneira e com a solução enzimática produzida por *Bacillus* sp. SMIA-2.

	Tecidos	Parâmetro L*	Chroma
Ovo	Controle	75,97 ± 0,11	13,52 ± 0,19
	Água	75,50 ± 0,10	13,80 ± 0,38
	Enzima	78,93 ± 0,42	13,50 ± 0,24
Chocolate	Controle	62,89 ± 0,06	17,74 ± 0,04
	Água	63,57 ± 0,11	16,32 ± 0,03
	Enzima	60,00 ± 0,20	13,91 ± 0,44
Sangue	Controle	45,61 ± 0,20	11,73 ± 0,07
	Água	44,16 ± 0,03	12,14 ± 0,19
	Enzima	56,07 ± 0,40	8,66 ± 0,61

Em relação aos tecidos sujos com chocolate foi observado que após a lavagem com a solução enzimática, o parâmetro “L” não diferiu em relação à lavagem com água. Entretanto, o parâmetro croma foi menor em relação à lavagem com água apenas. Finalmente, os tecidos sujos com sangue após a lavagem com a solução enzimática apresentaram valores maiores do parâmetro “L” e menores do parâmetro croma quando comparados com as roupas lavadas

apenas com água.

Estes resultados significam roupas com menos intensidade de cor, o que foi confirmado pela fotografia dos tecidos apresentados na Figura 13. Portanto, a solução enzimática produzida por *Bacillus* sp. SMIA-2 foi eficiente na remoção de manchas de sangue de tecidos de roupas, devido principalmente à presença de maiores níveis de proteases no extrato.



Figura 13: Remoção de manchas de tecidos sujos com ovo, chocolate e sangue utilizando solução enzimática de *Bacillus* sp. SMIA- 2 a 50°C por 60 minutos e 150 rpm.

Resultados similares foram observados por Hmidet et al. (2009), em que um detergente comercial aditivado com uma preparação enzimática de *B. licheniformis* NH1 contendo tanto α -amilase e protease melhorou significativamente o desempenho da remoção de manchas de sangue, chocolate e molho barbecue. Além disso, Bhunia e Dey (2012) observaram que a adição de um extrato bruto de protease de *Bacillus licheniformis* NCIM 2042 ao detergente RIM melhorou a sua performance na remoção de manchas de sangue em tecidos de roupas.

Paul et al. (2014) realizaram estudos com enzima keratinase alcalina de *Paenibacillus woosongensis* TKB2, que apresentou potencial de aplicação na lavagem de tecidos, removendo as manchas de sangue de panos cirúrgicos e deu um resultado notável para remoção da mancha de composto de sangue, gema de ovo e mancha de chocolate em um curto período sem alterar a textura das fibras dos tecidos.

Ressalta-se que no processo de lavagem dos tecidos padrão utilizados neste trabalho, as enzimas não foram adicionadas a detergentes comerciais, o que poderia aumentar a eficácia da remoção do sangue dos tecidos.

5.3.5. Aplicação das enzimas na limpeza de lentes de contato

Considerando que as enzimas estudadas apresentaram propriedades tais como boa estabilidade a valores alcalinos de pH, testes foram realizados a fim de verificar a possibilidade de aplicação do extrato multienzimático produzido por *Bacillus* sp. SMIA-2 na limpeza de lentes de contato. Para esta aplicação é preferível que as enzimas tenham atividade substancial a pH entre 7,0-8,5. Como as proteases se destacam entre as enzimas mais utilizadas na limpeza de lentes de contato, os testes foram realizados utilizando esta enzima.

Inicialmente, a estabilidade das proteases com os agentes oxidantes peróxido de hidrogênio e perborato de sódio foi estudada, pois estão normalmente presentes juntamente com as enzimas nas soluções de limpeza de lentes de contato. As proteases foram estáveis quando incubadas a 30°C na presença de 0,1% (m/v) de perborato de sódio (Figura 14a). A 50°C foi observada uma redução na estabilidade das enzimas quando incubadas por 60 e 180 minutos (Figura 14b).

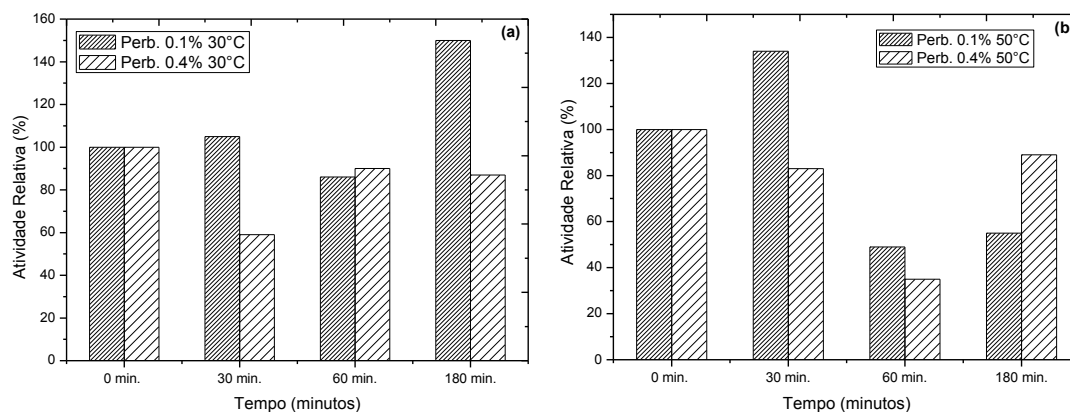


Figura 14: Estabilidade das proteases de *Bacillus* sp. SMIA-2 na presença de Perborato de Sódio a 30°C (A) e 50°C (B).

Na presença de outro agente oxidante, peróxido de hidrogênio as enzimas foram estáveis quando incubadas a 30°C na concentração de 1,5% (m/v). Quando incubadas a 50°C, foi observado que com o aumento do tempo de incubação e da concentração do oxidante para 3,0% (m/v) a atividade das proteases decresceu (Figura 15).

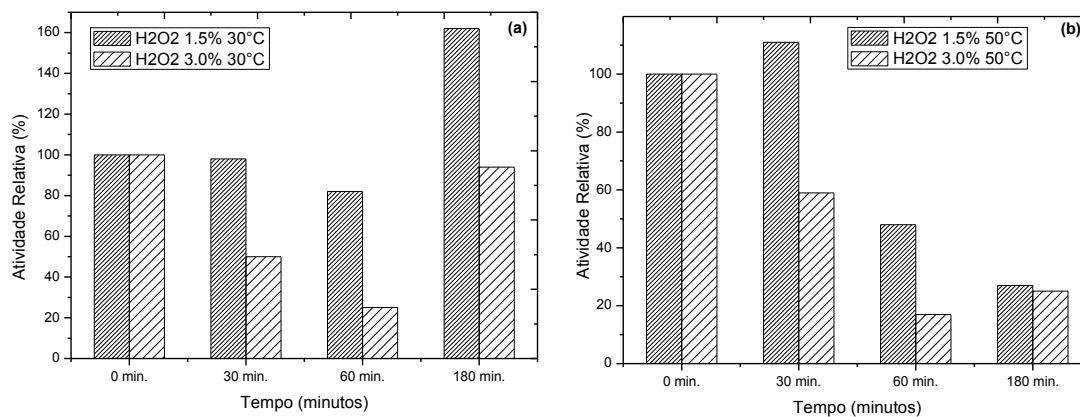


Figura 15: Estabilidade das proteases na presença de peróxido de hidrogênio a 30°C (A) e 50°C (B).

Considerando então a boa estabilidade das proteases nos oxidantes testados a 30°C, a aplicação das enzimas produzidas neste trabalho na limpeza de lentes de contato foi investigada. Na Tab. 13 são apresentados os resultados da digestão da lisozima, o principal componente do biofilme associado com a sujeira de lentes de contato, pelas proteases produzidas por *Bacillus* sp. SMIA-2.

Uma protease comercial (Savinase® 16,0 U/g, SIGMA) foi utilizada para efeito de comparação.

Tabela 14: Degradação da lisozima por proteases de *Bacillus* sp. SMIA-2 e por uma protease comercial

Enzimas	ABS_{280nm} (%)	
Controle	1,61	100
Protease Comercial sem H ₂ O ₂	1,58	98
Protease Comercial com H ₂ O ₂	1,61	100
Extrato Dialisado sem H ₂ O ₂	1,16	72
Extrato Dialisado com H ₂ O ₂	1,20	75

Os resultados revelaram que embora a protease comercial seja substancialmente mais efetiva que a protease de *Bacillus* sp SMIA-2 (números mais altos indicam maior digestão, exceto o controle), houve uma degradação relativa de 72% e 75% da lisozima por 60 minutos na ausência e presença do peróxido de hidrogênio, respectivamente. Os resultados obtidos neste estudo foram superiores aos apresentados por (Greene et al., 1996).

6. RESUMO E CONCLUSÕES

Bacillus sp. SMIA-2 produziu máximas atividades de proteases, α -amilases, poligalacturonases, xilanases e celulases enzimas hidrolíticas quando cultivado em meio de cultivo a base de farinha da casca de maracujá (0,5%) e água de maceração de milho (0,5%) por 72 horas.

A otimização das condições do meio de cultivo utilizando a técnica de planejamento fatorial em dois níveis (2^2), em relação às variáveis independentes, concentração de farinha da casca do maracujá (FMC) e pH inicial do meio de cultura, mostrou que a concentração de farinha da casca do maracujá foi a que exerceu efeito significativo em todas as variáveis respostas observadas, enquanto que o pH inicial do meio exerceu efeito significativo somente na atividade enzimática das enzimas proteases, poligalacturonase, xilanases e avicelases, com um limite de confiabilidade de 95%.

Após a purificação parcial, as enzimas aumentaram consideravelmente suas atividades, destacando-se as proteases. A temperatura ótima das avicelases, xilanases, poligalacturonases e proteases foi 70°C, enquanto da α -amilase foi 90°C. Em relação à termoestabilidade, as enzimas apresentaram estáveis à temperatura de 50°C e em pH alcalino na faixa de 7,5-9,5.

A protease presente no extrato enzimático foi estável por 180 minutos a 30°C-50°C na presença de oxidantes, foi eficiente na degradação da lisozima e na remoção de sujidades de sangue em tecidos padrão. Diante do exposto, pode-se concluir que a utilização de farinha da casca de maracujá pode ser utilizada como uma fonte alternativa de baixo valor comercial para a produção de enzimas extracelulares por *Bacillus sp.* SMIA-2, com potencial para aplicação em processos de limpeza.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abate, C.M. (1999). Production of amylolytic enzymes by *Bacillus amyloquefaciens* in pure culture and in co-culture with *Zymomonas mobilis*. *Biotechnology letters*, v. 21, n. 3, pg. 249-252.
- Ali, Z. M., Brady, C.J. (1982). Purification and characterization of the polygalacturonases of tomato fruits. *Aust J Plant Physiol*. V. 9, p. 155-169.
- Almeida, M. (2013). *Seleção de fungos filamentosos produtores de xilanases e celulases utilizando resíduos agroindustriais*. Dissertação (Mestrado em Conservação e Manejo de Recursos Naturais). Cascavel – Pr, 35p.
- Andrade, M.V.V., Delatorre, A.B., Ladeira, S.A., Martins, M.L.L. (2011). Production and partial characterization of alkaline polygalacturonase secreted by thermophilic *Bacillus* sp. SMIA-2 under submerged culture using pectin and corn steep liquor. *Ciência E Tecnologia de Alimentos*, 31(004171), 204–208.
- Andrade, C.M.M.C., Pereira Jr., N., Antanikian, G. (1999). Extremely Thermophilic Microorganisms and their polymer-hydrolytic enzymes. *Revista de Microbiologia*, 30:287-298.
- Andreas, F., Bon, E.P.S., Ferreira-Leitão, V.S. (2014). Enzyme technology in Brazil – A need and challenge. *Biocatalysis and biotransformation*, 32(1):1.
- Antranikian, G. (1991). *Microbial degradation of starch, Microbial degradation of natural products* (Winkelman, G., ed.) pp. 282-56, Weinheim, Germany.
- Adrio, J.L., Demain, A.L. (2014). Microbial Enzymes: Tools for Biotechnological Processes. *Biomolecules*, 4, 117-139.
- Araújo, L.F., Medeiros, A.N., Perazzo Neto, A., Oliveira, L.S.C., Silva, F.L.H. (2005). Protein enrichment of cactus Pear (*Opuntia ficus – indica* Mill) using *Saccharomyces cerevisiae* in solid-state fermentation. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, Curitiba, v.48, special n., p.161-168.
- Asoodeh, A.; Chamanic, J.; Lagziana, M. (2010). A novel thermostable, acidophilic α -

- amylase from a new thermophilic "*Bacillus sp. Ferdowsicus*" isolated from Ferdows hot mineral spring in Iran: Purification and biochemical characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*. 46:289- 297.
- Atomi, H. (2005). Recent progress towards the application of hyperthermophiles and their enzymes. *Current Opinion in Chemical Biology* .9:166-173.
- Barbosa, J.B., Gentil, N.O., Ladeira, S.A., Martins, M.L.L. (2014). Cheese whey and passion fruit rind flour as substrates for protease production by *Bacillus sp.* SMIA-2 strain isolated from Brazilian soil. *Biocatalysis and Biotransformation*, Early Online: 1–7.
- Barbosa, J.B. (2011). Aproveitamento de soro de queijo e farinha da casca de maracujá para produção de proteases e alfa-amilases por *Bacillus sp.* SMIA-2. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 95p.
- Barros Neto, B., Scarminio, I.S., Bruns, R.E. (2001). *Como Fazer Experimentos: Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria*. Campinas: EDUNICAMP, pp. 406.
- Beg, Q.K., Saxena, R.K., Gupta, R. (2002) De-repression and Subsequent induction of protease synthesis by *Bacillus mojavensis* under fed batch operations. *Process Biochemistry*, 78:289-295.
- Beg, Q.K., Kapoor, M., Tiwari, R.P., Hoondal, G.S. (2001). Bleach-boosting of eucalyptus kraft pulp using combination of xylanase and pectinase from *Streptomyces sp.* QG-11-3. *Res Bull Panjab University* 57: 71–8.
- Blanco P., Sieiro C., Villa T.G., (1999). Production of pectic enzymes in yeasts. *FEMS Microbiol Lett* 175: 1–9.
- Bon, E.P.S., Ferrara, M.A., Corvo, M.L. (2008) *Enzimas em Biotecnologia: produção, aplicações e mercado*. Rio de Janeiro: Interciência. 506p.
- Brijwani, K., Oberoi, H.S., Vadlani, P.V. (2010). Production of a cellulolytic enzyme system in mixed-culture solid-state fermentation of soybean hulls supplemented with wheat bran. *Process Biochemistry*, v. 45, p. 120-128.
- Campbell, L.L. (1995). Purification and properties of an α -amylases from facultative thermophilic bacteria. *Arch. Biochem. Biophys.*154-161.
- Cardoso, C.L. (2009). Imobilização de enzimas em suportes cromatográficos: uma ferramenta na busca por substâncias bioativas. *Quim. Nova*, Vol. 32, No. 1, 175-187.
- Carmelo, V., Florido, A., Vinhas, I., Roseiro, J.C. (2002). Physiological responses of *Bacillus stearotherophilus* continuous culture to carbon source concentration and temperature shifts. *Process Biochemistry*, 38:763-770.

- Carvalho, R.V., Correa, T.L.R., Silva, J.C.M., Viana, A.P., Martins, M.L.L. (2008a). Otimização das condições de cultivo para a produção de amilases pelo termofílico *Bacillus sp.* e hidrólise de amidos pela ação da enzima. *Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 28, n.1, p.1-7.
- Carvalho, R.V., Corrêa, T.L.R., Silva, J.C.M., Mansur, L.R.C.O., Martins, M.L.L. (2008b). Properties of an amylase from thermophilic *Bacillus sp.* *Brazilian Journal of Microbiology*, 39, p. 102-107.
- Castro, A.M., Carvalho, M.L.A., Leite, S.G.F., Pereira JR, N. (2010) Cellulases from *Penicillium funiculosum*: production, properties and application to cellulose hydrolysis. *J. Ind. Microbiology Biotechnology*. v. 37, p. 151-158.
- Castro, A.M., Pereira Jr., N. (2010). Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. *Quim. Nova*, 33:181-188.
- Cazarin, C.B.B., Silva, J.K., Colomeu, T.C., Zollner, R.L.Z., Maróstica Junior, M.R. (2014). Capacidade antioxidante e composição química da casca de maracujá (*Passiflora edulis*). *Ciência Rural*, Santa Maria, v.44, n.9, p.1699-1704.
- Chandra Chandra, A.K., Medda, S., Bhadra, A.K. (1980). Production of extracellular thermostable α -amilase by *Bacillus licheniformis*. *J. Ferment. Technol.*1-10.
- Collins, T., Gerday, C., Feller, G. (2005). Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 29, p. 3-23, 2005.
- Cordeiro, C.A.M., Martins, M.L.L. (2009). Produção de poligalacturonases pelo termofílico *Bacillus sp.* SMIA-2 e algumas propriedades da enzima. *Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 29, p. 1-7.
- Cordeiro, C.A.M., Martins, M.L.L., Luciano, A.B., Silva, R.F.D. (2002). Production and properties of xylanase from Thermophilic *Bacillus sp.* *Braz Arch Biol Technol* 45(4):413-418.
- Córdova, K.R.V., Gama, T.M.M.T.B., Winter, C.M.G., Neto, G.K., Freitas, R.J.S. (2005). Características físico-químicas da casca do maracujá amarelo (*Passiflora edulis flavicarpa* Degener) obtida por secagem. *Bol Cent Pesqui Process Aliment* 23: 221-230.
- Correia, R.T.P. (2004). *Estudo do cultivo semi-sólido em resíduo de abacaxi por Saccharomyces cerevisiae e Rhizopus oligosporus*. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal, RN.
- Costa, C.M.L. (2010). *Caracterização e análise experimental do recobrimento de sementes de jambu (Spilanthes oleracea) em leite fluidizado*. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Unicamp, Campinas – SP.
- Delatorre, A.B., Ladeira, S.A., Andrade, M.V.V., Barbosa, J.B., Martins, M.L.L. (2010). Microrganismos termofílicos e enzimas termoestáveis de importância comercial. *Revista Perspectivas online*, vol. 4, n. 16, 132–145.

- Demain, A.L., Adrio, J.L. (2008). Contributions of microorganisms to industrial biology. *Mol. Biotechnol.* 38, 41–45.
- De Marco, G.E. (2012) *Produção e caracterização de celulases produzidas por um isolado de Bacillus sp.* Dissertação-Porto Alegre-RS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRS, 87p.
- De Vries, R.P., Jansen, J., Aguilar, G., Parenicova, L., Joosten, V., Wulfert, F., Benen, J.A., Visser, J. (2002). Expression profiling of pectinolytic genes from *Aspergillus niger*. *FEBS Letters*, Vol.530, pp. 41-47.
- Dixon, M., Webb, E.C. (1979). *Enzymes*. Academic Press: New York.
- Dhillon, G.S., Oberoi, H.S., Kaur, S., Bansal, S., Brar, S.K. (2011). Value-addition of agricultural wastes for augmented cellulase and xylanase production through solid-state tray fermentation employing mixed-culture of fungi. *Ind Crop Prod* 34:1160–1167.
- Do Canto, W.L., Menezes, T.J.B. (1995). *Estudos Econômicos – Alimentos Processados: Produção, usos e mercado de enzimas*. Campinas, Instituto de Tecnologia de Alimentos – ITAL.
- Ellouz, Y., Bayoudh, S., Kammoun, N., Gharsallah, N., Nasri, M. (2001). Production of protease by *Bacillus substilis* grown on sardinelle heads and viscera flour. *Biores. Technol.* 80: 49-51.
- Egorova K., Antranikian, G. (2005). Industrial relevance of thermophilic Archaea. *Current Opinion in Microbiology.* 8: 649-655.
- Ernandes, F.M.P. G., Boscolo, M., Cruz, C.H.G. (2010). Influência da composição do meio para a produção de *Zimomonas mobilis*. *Acta Scientiarum. Technology*, v. 32, n. 1, p 21-26.
- Fedatto, L.M. (2004). *Caracterização de proteases extracelulares produzidas por Xylella fastidiosa de citros e videira*. Dissertação (Mestrado em Ecologia de Agroecossistemas) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 70p.
- Fellows, P. (1994). *Tecnología del Procesado de Los Alimentos: Principios e Prácticas*. Zaragoza: Editorial Acribia, p. 172-177.
- Ferrari R.A., Colussi, F., Ayub, R.A. (2004). Characterization of by-products of passion fruit industrialization utilization of seeds. *Rev Bras Frutic.* 26: 101-102.
- Ferraz, A.L. (2010). Fungos decompositores de materiais lignocelulósicos. IN: E. Esposito; J.L. AZEVEDO (EDS.); *Fungos: Uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia*. segunda ed., P.215–245, Caxias do Sul: EducS.
- Gacesa, P., Hubble, J. (1990). *Tecnología de las enzimas*. Ed Acribia, S.A. Zagarosa-Espanha.

- Genckal, H., Tari, C. (2006). Alkaline protease production from alkalophilic *Bacillus sp.* Isolated from natural habitats. *Enzyme and Microbial Technology*, 39:703-710.
- Gentil, N.O. (2014). *Purificação de proteases termorresistentes secretadas por Bacillus sp. SMIA-2 em culturas submersas contendo substratos de baixo custo*. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal). Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 58p.
- Gessesse, A., Hatti-Kaul, R., Gashe, B.A., Mattiasson, B. (2003). Novel alkaline proteases from alkaliphilic bacteria grown on chicken feather. *Enzyme Microbiology Technology*, 32:519–524.
- Gírio, F.M., Fonseca, C., Carvalheiro, F., Duarte, L.C., Marques, S., Bogel-Lukasik, R. (2010). Hemicelluloses for fuel ethanol: a review. *Bioresource Technology*, vol. 101, n. 13, p. 4775-4800.
- Ghorbel, B., Kamoun, A.S., Nasri, M. (2003). Stability studies of protease from *Bacillus cereus* BG1. *Enzyme and Microbial Technology*. 32:513-518.
- Ghose, T.K. (1987). Measurement of cellulase activities. *Pure & Appl. Chem.*, Vol. 59, n. 2, pp. 257-268.
- Godfrey, T., West, S. (1996). *Industrial Enzimology*. 2d. Ed. Stockton Press Ed. US e Canadá, 609p.
- Gomes, E., Guez, M.A.U., Martin, N., Silva, R. (2007). Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. *Revista Química Nova*. 30:136-145.
- Goyal, N., Gupta, J.K., Soni, S.K. (2005). A novel raw starch digesting thermostable α -amylase from *Bacillus sp.* I-3 and its use in the direct hydrolysis of raw potato starch. *Enzyme Microbial Technology* 37, 723–734.
- Graminha, E.B.N., Gonçalves, A.Z.L., Pirota, R.D.P.B., Balsalobre, M.A.A, Gomes, E.R.S. (2008). Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition. *Animal Feed Science and Technology*, v. 144, p. 1–22.
- Greene, R.V., Griffin, H.L., Cotta, M.A. (1996). Utility of alkaline protease from marine *Shipworm bacterium* in industrial cleansing applications. *Biotechnology Letters*, vol. 18 no.7 p.759-764.
- Guimaraes, N.C.A., Sorgatto, M., Peixoto-Nogueira, S.C., Betini, J.H.A., Zanoletto, F.F., Marques, M.R., Polizeli, M.L.T.M., Giannesi, G.C. (2013). Bioprocess and biotechnology: effect of xylanase from *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus* on pulp biobleaching and enzyme production using agroindustrial residues as substrate. *SpringerPlus*, 2:380
- Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V.K. Chauhan, B. (2003). Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochemistry*. v. 38, p. 1599-1616.
- Gupta, R., Beg, Q.K., Lorenz, P. (2002a). Bacterial alkaline proteases: molecular

- approaches and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59, 15-32.
- Gupta, R., Beg, Q.K., Khan, S., Chauhan, B. (2002b). An overview on fermentation, downstream processing and properties of alkaline protease. *Applied Microbiology and Biotechnology* 60:381-395.
- Guertzenstein, S.M.J., Srur, A.U.O.S. (2002). Uso da casca de maracuja (*Passiflora edulis*, f. *flavicarpa*, DEG) cv amarelo na alimentacaode ratos (*rattus norvergicus*) normais e diabeticos. *Rev. Cadernos do Centro Universitário Sao Camilo*,10(2) 213-218.
- Hadj-Ali, N. Saxena, R.K., Gupta, R. (2007). Biochemical and molecular characterization of a detergent stable alkaline serine-protease from a newly isolated *Bacillus licheniformis* NH1. *Enzyme and microbial Technology*, 40, 515-523.
- Hakamada, Y., Koike, K., Yoshimatsu, T., Mori, H., Kobayashi, T., Ito, S. (1997). Thermostable alkaline cellulase from an alkaliphilic isolate, *Bacillus* sp. KSM- 237. *Extremophiles*. v. 1, p. 151–156.
- Haki, G.D., Rakshit, S.K. (2003). Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresource Technology*. 89:17-34.
- Hartzell, M.M., Hsieh, Y.L. (1998). Enzymatic scouring to improve cotton fabric wettability. *Text. Res. J.*, v. 68, n. 4, p. 233-241.
- Hasan, F., Ali Shah, A., Hameed, A. (2006). Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme Microb. Technol.*, 39, 235.
- Hartmann, M., Miller, R.E., Toennies, J.P., Vileso, V.A. (1995). Rotationally Resolved Spectroscopy of SF₆ in Liquid Helium Clusters: A Molecular Probe of Cluster Temperature. *Phys. Rev. Lett.* V. 75, p. 1566–1569, 1995.
- Hernández, M.S., Rodríguez, M.R., Gerra, N.P., Rosés, R.P. (2006). Amylase production by *Aspergillus niger* in submerged cultivation on two wastes from food industries. *Journal of Food Engineering*, v. 73, p. 93-100.
- Hmidet, N., El-Hadj Ali, N., Haddar, A., Kanoun, S., Alya, S., Nasri. (2009). Alkaline proteases and thermostable α -amylase co-produced by *Bacillus licheniformis* NH1: Characterization and potential application as detergent additive. *Biochemical Engineering Journal*, vol. 47, n. 1-3, p. 71-79.
- Holanda, H.D. (1991). *Obtenção de um material pectínico a partir do resíduo (casca) de maracujá amarelo*. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, 96p.
- Hough, D.W., Danson, M.J. (1999). Extremozymes. *Current opinion in chemical Biology*, 3: 39-46.
- Howard, R.L., Masoko, P., Abotsi, E. (2003). Enzyme activity of a Phanerochaete chrysosporium cellobiohydrolase (CBHI.1) expressed as a heterologous protein

- from *Escherichia coli*. *African Journal of Biotechnology*. V. 2, n. 9, p. 296-300.
- Hubbard, M.R. (2003). *Statistical Quality by control for food industry: Design of Experiments*. 3 ed. New York: Kluwer Academic.
- Ishimoto, F.Y., Harada, A.I., Branco, I.G., Conceição, W.A.S., Coutinho, M.R. (2007). Aproveitamento Alternativo da Casca do Maracujá-Amarelo (*Passiflora edulis* f. var. *flavicarpa* Deg.) para Produção de Biscoitos. *Revista Ciências Exatas e Naturais*. Vol. 9, nº2.
- Ichimura, T., Yamanaka, A., Ichiba, T., Toyokawa, T., Kamada, Y., Tamamura, T., Maruyama, S. (2006). Antihypertensive effect of an extract of *Passiflora edulis* rind spontaneously hypertensive rats. *Biosci Biotech Bioch* 70: 718-721.
- Janssen, P.H., Peek, K., Morgan, H.W. (1994). Effect of culture conditions on the production of an extracellular proteinase by *Thermus* sp.Rt41A. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41, 400-406.
- Jayani, R. S., Saxena, S., Gupta, R. (2005). Microbial pectinolytic enzymes: A review. *Process Biochemistry*. V. 40, p. 2931–2944.
- Johannes, T.W., Zhao, H. (2006). Directed evolution of enzymes and biosynthetic pathways. *Curr. Opin. Microbiol.* 9, 261–267.
- Johnvesly, B., Naik, G.R. (2001). Studies on production of thermostable alkaline protease from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. JB-99 in a chemically defined medium. *Process Biochemistry*, 37: 139-144.
- Joo, H.S., Chang, C.S. (2005). Production of protease from a new alkalophilic *Bacillus* sp. I-312 grow on soybean meal: optimization and some properties. *Process Biochemistry*. 40:1263-1270.
- Joo, H., Kumar, C.G., Park, G., Kim, K.T., Paik, S.R., Chang, C. (2002). Optimization of the production of an extracellular alkaline protease from *Bacillus horikoshii*. *Process Biochemistry*. v. 38, p. 155-159.
- Karmakar, M., Ray, R.R. (2011). Current Trends in Research and Application of Microbial Cellulases. *Research Journal of Microbiology*, 6:41-53.
- Kapoor, M., Kuhad, R.C. (2002). Improved polygalacturonase production from *Bacillus* sp. MG-cp-2 under submerged (SmF) and solid state (SSF) fermentation. *Letters in Applied Microbiology* 34, 317–322.
- Kim, D.S., Kim, C.H. (1992). Production and characterization of crystalline cellulose-degrading cellulase components from a thermophilic and moderately alkalophilic bacterium. *J Microbiol Biotechnol*, 2;2:7–13.
- Kirk, O., Borchert, T.V., Fuglsang, C.C. (2002). Industrial enzyme applications. *Curr. Opin. Biotechnol.*, v. 13 n. 4, p. 345-351.

- Kliemann, E., Simas, K.N., Amante, E.R., Prudêncio, E., Teófilo, R.F., Ferreira, M.M.C., Amboni, R.D.M.C. (2009). Optimisation of pectin acid extraction from passion fruit peel (*Passiflora edulis flavicarpa*) using response surface methodology. *International Journal of Food Science and Technology*, 44, 476–483.
- Koblitz, M.G.B. (2013). *Bioquímica de alimentos: Teoria e aplicações práticas*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro – RJ, 242p.
- Koeller, K.M., Wong, C.H. (2001). Enzymes for chemical synthesis. *Nature*. 409, 232.
- Kostylev, M., Wilson, D. (2012). Synergistic interactions in cellulose hydrolysis. *Biofuels*, 3(1), 61–70.
- Kuberan, T., Sangaralingam, S., Arasu, S.T. (2010). Isolation and optimization of Protease producing Bacteria from Halophilic soil. *J. Biosci. Res.*, Vol. 1(3):163-174.
- Kubicek, C.P., Messner, R., Gruber, F., Mach, R.L., Kubicek-Pranz, E.M. (1993) The *Trichoderma reesei* cellulase regulatory puzzle: from the interior life of a secretory fungus. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 15, p. 90-99.
- Kumar, C.G., Takagi, H. (1999). Research review paper Microbial Alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. *Biotechnology Advances*. 17:561-594.
- Ladeira, S.A., Cruz, E., Delatorre, A.B., Barbosa, J.B., Martins, M.L.L. (2015). Cellulase production by thermophilic *Bacillus* sp. SMIA-2 and its detergent compatibility. *Electronic Journal of Biotechnology*, xxx, xxx–xxx.
- Ladeira, S.A. (2013). Aproveitamento de resíduos agroindustriais para a produção de celulasas e xilanasas por espécies de *Bacillus* sp. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 164p.
- Ladeira, S.A., Delatorre, A.B., Andrade, M.V.V., Martins, M.L.L. (2012). Nota Científica: Utilização da pectina, proteínas do soro de queijo e água de maceração de milho para a produção de proteases por *Bacillus* sp. termofílico. *Brazilian Journal of Food Technology*, Campinas, 15, 92–98.
- Ladeira, S.A., Andrade, M.V.V., Delatorre, A.B., Perez, V.H., Martins, M.L.L. (2010) Utilização de resíduos agroindustriais para a produção de proteases pelo termofílico *Bacillus* sp. em fermentação submersa: otimização do meio de cultura usando a técnica de planejamento experimental. *Revista Química Nova*, Vol. XY, No. 00, 1-5.
- Ladeira, S.A. (2009). *Otimização de um meio de cultura para a produção de proteases por Bacillus sp. SMIA-2 e propriedades da enzima*. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 88p.
- Larrauri, J.A., Cerezal, P. (1993). Caracterización de los residuos de diferentes variedades de Mango. *Alimentaria*. 30 (242): 89-92.

- Lee, P.C., Lee, S.Y., Hong, S.H., Chang, H.N. (2003). Batch and continuous cultures of *Mannheimia succiniciproducens* MBEL55E for the production of succinic acid from whey and corn steep liquor. *Bioprocess Biosyst Eng.* 26:63-67.
- Li, S., Yang, X., Yang, S., Zhu, M., Wang, X. (2012). Technology prospecting on enzymes: Application, marketing and engineering. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 2, 1–11.
- Liang, Y., Yesuf, J., Schmitt, S., Bender, K., Bozzola, J. (2010). Study of cellulases from a newly isolated thermophilic and cellulolytic *Brevibacillus* sp. strain JXL. *J Ind Microbiol Biotechnol.*, 36:961-70.
- Lima, U.A., Aquarone, E., Borzani, W., Schmidell, W. (2001) *Biotecnologia industrial. V3: Processos Fermentativos e Enzimáticos.* 1ªed. Editora Edgard Blucher Ltda. 616p.
- Liu, Y., Shi, J., Langrish, T.A.G. (2006). Water-based extraction of pectin from flavedo and albedo of orange peels. *Chem. Eng. J.* 120, 203–209.
- Lynd, L.R., Weimer, P.J., Van, Z.Y.L, W.H., Pretorius, I. S. (2002). Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. Microbiology and molecular biology reviews. *American Society for Microbiology.* v. 66, n.3, p. 506-577.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J. (Eds.). (2010). *Microbiologia de Brock.* 12ª Edição. Porto Alegre: Editora Artmed.
- Maheshwari, R., Bharadwaj, G., Bhat, M.K. (2000). Thermophilic Fungi: Their Physiology and Enzymes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* p. 461–488, Sept.
- Mahmood, A.U., Greenman, J., Scragg, A.H. (1998). Orange and potato peel extracts: Analysis and use as *Bacillus* substrates for the production of extracellular enzymes in continuous culture. *Enzyme Microbial Technol.*, 22, 130-137.
- Makky, E.A. (2009). Avicelase production by a thermophilic *Geobacillus stearothermophilus* isolated from soil using sugarcane bagasse. *World Acad Sci Eng Technol*, 57, pp. 487–491.
- Maller, A. (2008). Produção, Purificação e Caracterização do Complexo Pectinolítico do Fungo *Aspergillus niveus*. Dissertação (Mestrado em Ciências: Bioquímica) – Ribeirão Preto – SP, Universidade de São Paulo – USP, 122p.
- Malpiedi, L.P., Romanini, D., Picó, G.A., Nerli, B.B. (2009). Purification of trypsinogen from bovine pancreas by combining aqueous two-phase partitioning and precipitation with charged flexible chain polymers. *Separation and Purification Technology.* 65 , 40–45.
- Markoglou, N., Wainer, I.W. (2003) *Bioanalytical Separations.* Wilson, I.D., ed.; Elsevier Science: New York, cap. 7.

- Martins, C.B., Guimarães, A.C.L., Pontes, M.A.N. (1985). Estudo tecnológico e caracterização física, físico-química e química do maracujá (*Passiflora edulis f. flavicarpa Deg.*) e seus subprodutos. (*Relatório de pesquisa, 4*). Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 23p.
- Medeiros, A.B.P., Pandey, A., Freitas, R.J.S., Christen, P., Soccol, C.R. (2000). Optimization of the production of aroma compounds by *Kluyveromyces marxianus* in solid-state fermentation using factorial design and response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal*, v. 6, 33-39.
- Medina, J.C. (1980). Subprodutos. In MEDINA, J. C. et al., *Maracujá: da cultura ao processamento e comercialização*. Campinas: Inst Tecnol. Alim. p.145-148.
- Meletti, L.M.M., Brückner, C.H. (2001). Melhoramento Genético. In: Brückner, C.H., Picanço, M.C. *Maracujá: tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria, mercado*. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2001. p. 345-385.
- Merheb, C.W., Cabral, H., Gomes, E., Silva, R. (2007). Partial characterization of protease from a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus*, and its hydrolytic activity on bovine casein. *Food Chemistry*, 104, 127–131.
- Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal. Chem* 3: 426-428.
- Ming Chu, I., Lee, C., Li, T.S. (1992) Production and degradation of alkaline protease in batch cultures of *Bacillus subtilis* ATCC 14416. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 14, n. 4, p. 755-761.
- Moon, S.H., Parulekar, S.J. (1992). Some Observations on Protease Production in continuous Suspension Cultures of *Bacillus firmus*. *Biotechnology and Bioengineering*, 41:43-54.
- Mussato, S.I., Fernandes, M., Milagres, A.M.F. (2007). Enzimas: ferramentas poderosa na industria. *Instituto Ciência Hoje*. 41:28-33.
- Nascimento, W.C.A., Carvalho, R.V., Silva, C.R., Martins, M.L.L. (2007). Otimização de um meio de cultura para a produção de proteases por um *Bacillus sp.* termofílico. *Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 27:417-421.
- Nascimento, W.C.A. (2005). Estudos sobre a secreção de proteases por *Bacillus sp.* SMIA-2 e sua compatibilidade com detergentes comerciais. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 96p.
- Nascimento, W.C.A., Martins, M.L.L. (2004). Production and properties of an extracellular protease from thermophilic *Bacillus sp.* *Brazilian Journal of Microbiology*, 35:91-96
- Niehaus, F., Bertoldo, C., Kahler, M., Antranikian, G. (1999). Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. *Applied Microbiology Biotechnology*. v. 51, p. 711-29.

- Nielsen, R.I., Oxenbøll, K. (1998). Enzymes from fungi: their technology and uses. *Mycologist*, v. 12, n.3, p. 69-71.
- Nigam, P.S. (2013). Microbial enzymes with special characteristics for biotechnological applications, *Biomolecules*, v.3, p.597-611.
- Oliveira, L.R.C., Barbosa, J.B., Martins, M.L.L., Martins, M. (2014). Extracellular production of avicelase by the thermophilic soil bacterium *Bacillus* sp. SMIA-2, *Acta Scientiarum Biological Sciences*, Maringá, v. 36, n. 2, p. 215-222, Apr.-June.
- Oliveira, M.M., Campos, A.R.N., Dantas, J.P., Gomes, J.P., Silva, F.L.H. (2006). Isotermas de dessorção da casca do maracujá (*Passiflora edulis Sims*): determinação experimental e avaliação de modelos matemáticos. *Ciência Rural*. V.36, n.5, 1624-1629.
- Oliveira, A.N., Oliveira, L.A., Andrade, J.S., Júnior, A.F.C. (2006). Enzimas hidrolíticas extracelulares de isolados de rizóbia nativos da Amazônia Central, Amazonas, Brasil. *Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 26, n.4, p. 853-860.
- Oliveira, L.F., Nascimento, M. R. F., Borges, S.V., Ribeiro, P.C.N., Ruback, V.R. (2002). Aproveitamento alternativo da casca do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis F. Flavicarpa*) para produção de doce em calda. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v.22, n.3, p.259-262.
- Ortega, N., de Diego, S., Perez-Mateos, M., Busto, M.D., (2004). Kinetic properties and thermal behaviour of polygalacturonase used in fruit juice clarification. *Food Chem* 88: 209– 21.
- Pandey, A., Soccol, C.R., Nigam, P., Soccol, V.T., Vandenberghe, L.P.S., Mohan, R. (2000). Technological potential of agro-industrial residues. II: cassava bagasse. *Bioresouce Technology*. 74:81-87.
- Pandey, A., Selvakumar, P., Soccol, C.R., Nigam, P. (1999). Solid-state fermentation for the production of industrial enzymes. *Curr. Sci.*, v. 77, n. 1, p. 149-162.
- Pandey, A.; Soccol, C.R. (1998). Bioconversion of biomass: a case study of lignocellulosics bioconversions in solid state fermentation. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. v. 41, p. 379–390.
- Pastor, M.D., Lorda, G.S., Balatti, A. (2001). Protease obtention using *Bacillus subtilis* 3411 and amaranth seed meal medium at different aeration rates. *Brazilian Journal of Microbiology*. 32:6-9.
- Paul, T., Das, A., Mandal, A., Halder, S.K., Jana, A., Maity, C., DasMohapatra, P.K., Pati, B.R., Mondal, K.C. (2014). An efficient cloth cleaning properties of a crude keratinase combined with detergent: towards industrial viewpoint. *Journal of Cleaner Production*. 66, 672-684.

- Peixoto, A.B. (2006). *Estudo da produção de enzimas e gomas por leveduras selvagens coletadas em diversas regiões do Brasil*. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Campinas – SP, Universidade Estadual de Campinas, 84p.
- Peterson, G.L. (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry*. 83: 346-356.
- Pinheiro, E.R., Silva, I.M.D.A., Gonzaga, L.V., Amante, Edna R., Teófilo, R.F., Ferreira, M.M.C., Amboni, R.D.M.C. (2008) Optimization of extraction of high-ester pectin from passion fruit peel (*Passiflora edulis flavicarpa*) with citric acid by using response surface methodology. *Bioresource Technology*. 99 (2008) 5561–5566.
- Poll, H., Kist, B.B., Santos, C.E., Reetz, R.E., Silveira, D.N. (2013). *Anuário brasileiro da fruticultura 2013*. Santa Cruz do Sul: Gazeta Santa Cruz, 2013, p.21.
- Pszczola, D.E. (2001). Rice: not just for throwing. *Food Technology*, v. 55, n. 2, p. 53-59.
- Putzke, J.; Putzke, M.T.L. (2002). *Os Reinos dos Fungos Vol. 2*. Ed. da Universidade de Santa Cruz do Sul. Santa Cruz do Sul, RS.
- Rajmohan, S., Dodd, C.E.R., Waites, W.M. (2002). Enzymes from isolates of *Pseudomonas fluorescens* involved in food spoilage. *Journal of Applied Microbiology*, Oxford, v. 93, n. 2, p. 205-213.
- Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S., Deshpande, V.V. (1998). Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 597-635.
- Riou, C., Freyssinet, G., Fevre, M. (1992). Purification and characterization of extracellular pectinolytic enzyme produced by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 578–583.
- Rivas, B., Moldes, A.B., Domínguez, J.M., Parajó, J.C. (2004). Development of culture media containing spent yeast cells of *Debaryomyces hansenii* and corn steep liquor for lactic acid production with *Lactobacillus rhamnosus*. *Inter J of Food Microbiol*. 97:93-98.
- Rocha, C.P. (2010). *Optimização da produção de enzimas por *Apergillus níger* em fermentação no estado sólido*. Dissertação (Mestrado em Eng. Química). – Uberlândia – MG, Universidade Federal de Uberlândia – UFU, 136p.
- Rodrigues, P.M., Andrade, V.V.V., Martins, M.L.L. (2013). Stability and activity of the partially purified spray-dried protease from *Bacillus* sp. SMIA-2 and its characterization as a laundry detergent additive. *International Journal of Bioassays*. 02 (03), 562-567.
- Saito, K., Seko, M., Masatsuji, E. (1994). Detergent comprising isolated cellulase from *Bacillus* ferm bp-3431 or a mutant strain thereof, surfactant & builder. *US patent*: 5,314,637.

- Sajedi, R.H., Naderi-Manesh, H., Khajeh, K., Ahmadvand, R., Ranjbar, B., Asoodeh, A., Moradian, F. (2005). A Ca-independent α -amylase that is active and stable at low pH from the *Bacillus* sp.KR-8104. *Enzyme and Microbial Technology*, 36: 666-671.
- Sánchez, C. (2009). Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances*, v. 27, p. 185-194.
- Santos, E. (2008). *Utilização de enzimas produzidas por Trichoderma reesei e Aspergillus niger na extração de óleos essenciais*. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Araraquara – SP. Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho – UNESP, 125p.
- Sarikaya, E., Higasa, T., Adachi, M., Mikami, B. (2000). Comparison of degradation abilities of α - and β -amylase on raw starch granules. *Process Biochemistry*, 35: 711-715.
- Saxena, R.K., Dutt, K., Agarwal, L., Nayyar, P. (2007). A highly thermostable and alkaline amylase from *Bacillus* sp. PN5. *Bioresource Technology*, 98:260-265.
- Seixas, F.L., Fukuda, D.L., Turbiani, F.R.B. (2014). Extraction of pectin from passion fruit peel (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) by microwave-induced heating. *Food Hydrocolloids*, v. 38, p. 186–192.
- Schaub, S.M., Leonard, J.J. (1996). Composting: An alternative waste management option for food processing industries. *Trends in Food Science & Technology*, v.7, p.263-268.
- Sena, A.R, Koblitz, M.G.B., Neto, A.G., Uetanabaro, A.P.T. (2006). Seleção de fungos do semi-árido baiano secretores de hidrolases de interesse em alimentos. *Sitientibus*, Feira de Santana, n.35, p.91-98.
- Shi, J., Ebrik, M.A., Yang, B., Garlock, R.J., Balan, V., Dale, B.E., Pallapolu, V.R., Lee, Y.Y., Kim, Y., Mosier, N.S., Ladisch, M.R., Holtzapfle, M.T., Falls, M., Ramirez, R.S., Donohoe, B.S., Vinzant, T.B., Elander, R.T., Hames, B., Thomas, S., Warner, R.E., Wyman, C.E. (2011). Application of cellulase and hemicellulase to pure xylan, pure cellulose, and switchgrass solids from leading pretreatments. *Bioresource Technology*, 102:80–88.
- Silva, G.A.B., Almeida, W.E.S., Cortes, M.S., Martins, E.S. (2009) Produção e caracterização de protease obtida por *Gliocladium verticilloides* através da fermentação em estado sólido de subprodutos agroindustriais. *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial*, v. 3, n. 1, p. 28-41.
- Silva, C.R., Delatorre, A.B., Martins, M.L.L. (2007). Effect of the culture conditions on the production of an extracellular protease by thermophilic *Bacillus* sp.and some properties of the enzymatic activity. *Brazilian Journal of Microbiology*. 38:253-258.
- Singh, J., Batra, N., Sobti, C.R. (2001). Serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus* sp. SSR1. *Process Biochemistry*, 36:781-785.

- Singhania, R.R., Sukumaran, R.K., Patel, A.K., Laroche, C., Pandey, A. (2010). Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 46, n. 7, p. 541-549.
- Sivaramakrishnan, S.; Gangadharan, D.; Nampoothiri, K.M.; Soccol, C.R.; Pandey, A. (2006). α -Amylases from Microbial Sources - An Overview on Recent Developments. *Food Technology Biotechnology*. 44:173-184.
- Soundari G.S., Sashi, V. (2009). Microbial xylanase: its importante role in various industries. *Aslan Journal of Environmental Science*, vol. 3, n. 2, p. 191-195.
- Souza, L.A., Oliveira, L.S.C., Silva, F.L.H., Amorim, B.C. (2010). Caracterização da poligalacturonase produzida por fermentação semi-sólida utilizando-se resíduo do maracujá como substrato. *Rev. bras. eng. agríc. ambient.* vol.14 no.9 Campina Grande.
- Sharma, D.C., Satyanarayana, T. (2006). A marked enhancement in the production of a highly alkaline and thermostable pectinase by *Bacillus pumilus* dcsr1 in submerged fermentation by using statistical methods. *Bioresource Technology*, v. 97, p. 727–733.
- Soares, M.M.C.N., da Silva, R., Gomes, E. (1999). Screening of bacterial strains or pectinolytic activity: characterization of the polygalacturonase produced by *Bacillus* sp. *Revista de Microbiologia*, 30: 299-303.
- Souza, A.N., Martins, M.L.L. (2001). Isolation, properties and kinetics of growth of a thermophilic *Bacillus*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 32, 271-275.
- Souza, A.C.G., Sandi, D. (2001). Industrialização. *In: Maracujá: tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria, mercado*. Porto Alegre: Cinco continentes, 2001, p.305-343.
- Talcoot, S.T., Percival, S.S., Pittet-Moore, J., Celoria, A.C. (2003) Phytochemical composition and antioxidant stability of fortified yellow passion fruit (*Passiflora edulis*). *J. Agric. Food Chem.*, 51, 935-941.
- Tavares, V. B., Sivieri, K., Ceron, C.R., Silva, R., Trabuco, E., Lombardi, F. R., Gomes, E. (1998). Utilização do Resíduo Líquido de Indústria de Processamento de Suco de Laranja Como Meio de Cultura de *Penicillium Citrinum*: Depuração Biológica do Resíduo e Produção de Enzima. *Revista Química Nova*. 21:722-725.
- Tolner, B., Poolman, B., Konings, W.N. (1997). Adaptation of microorganisms and their transport systems to high temperatures. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol.118A. v. 3, p. 423-428.
- Tzanov, T., Calafell, M., Gübitz, G.M., Cavaco-Paulo, A. (2001). Bio-preparation of cotton fabrics. *Enzyme Microbiol. Technol.*, v. 29, n. 6-7, p. 357-362.

- Uenojo, M., Pastore, G.M. (2006). Isolamento e seleção de micro-organismos pectinolíticos a partir de resíduos provenientes de agroindústrias para produção de aromas frutais. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 26(3): 509-515.
- Ustáriz, F.J., Laca, A., García, L.A., Díaz, M. (2008) Fermentation conditions increasing protease production by *Serratia marcescens* in fresh whey. *Rev. Téc. Ing. Univ. Zulia*. Vol. 31, N°1, 79-89.
- Ustok F.I., Tari, C., Gogus, N. (2007). Solid-state production of polygalacturonase by *Aspergillus sojae* ATCC 20235. *Journal Biotechnology*. v. 127, p. 322-334, 2007.
- Van Der Maarel, M.J., Van Der Veen, B., Uitdehaag, J.C., Leemhuis, H., Dijkhuizen, L. (2002). Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. *Journal of Biotechnology*, 94, 137–155.
- Van Solingen, P. (1999). Alkaline cellulase and method of producing the same. *US patent*: 5,856,165.
- Vasconcelos, A., Cavaco-Paulo, A. (2006). Enzymatic removal of cellulose from cotton/polyester fabric blends. *Cellulose*, 13:611-618.
- Vieille, C. e Zeikus, J.G. (1996). Thermozyms: identifying molecular determinants of protein structural and functional stability. *Tibtech*. V. 14, p. 183-190.
- Vihinen, M., Mantsala, P. (1989). Microbial amyolytic enzymes. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* V. 24, p. 329-410.
- Wang, F., Podell, E.R., Zaug, A.J., Yang, Y., Baciú, P., Cech, T.R., Lei, M. (2007). The POT1-TPP1 telomere complex is a telomerase processivity factor. *Nature*, v. 445, p.506-510.
- Waites, M.J., Morgan, N.L., Rockey, J.S., Higton, G. (2001). *Industrial Microbiology*. Ed. Blackwell Publishing, 304p.
- Wiseman, A. (1985) *Manual de Biotecnologia de las enzimas*. Ed. Acribia, Zaragoza, Espanha.
- Yang, J.K., Shih, I.L., Tzeng, Y.M., Wang, S.L. (2000). Production and purification of protease from a *Bacillus subtilis* that can deproteinize crustacean wastes. *Enzyme Microbiology Technology*, 26:406–413.
- Yapo, B.M., Koffi, K.L. (2008). The polysaccharide composition of yellow passion fruit rind cell wall: chemical and macromolecular features of extracted pectins and hemicellulosic polysaccharides. *J. Sci. Food Agric.* 88:2125–2133.
- Zaghloul T.I., Wahab A.E., Mostafa M.H. (2000). Enhanced alkaline protease production in addition to α -amylase via constructing a *Bacillus subtilis* strain. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 84-86: 319-27.
- Zhang, P., Himmel, M.E., Mielenz, J.R. (2006). Outlook for cellulose improvement: Screening and selection strategies. *Biotechnology Advances*, 24:452-481.

- Zhang, C., Xing, X.H., Liu, M.S. (2004). Production of multienzymes consisting of alkaline amylase and cellulase by mixed alkalophilic culture and their potential use in the saccharification of sweet potato. *Biochem. Eng. J.* 19: 181-187.
- Zeilinger, S., Haller, M., Mach, R., Kubicek, C. P. (2000). Molecular characterization of a cellulase-negative mutant of *Hypocrea jeconina*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. v. 277, p. 581-588.
- Zeraik, M.L., Pereira, C.A.M., Zuin, V.G., Yariwake, J.H. (2010). Maracujá: um alimento funcional? *Rev. bras. farmacogn.* vol.20 no.3 Curitiba June/July.